

---

# **Rolle des nicht-neuronalen cholinergen Systems während der embryonalen Skelettentwicklung**

dem Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium

Vom Fachbereich genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Janine Klaczinski

aus Berlin

Darmstadt 2013

D17

---

---

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Paul G. Layer

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

eingereicht: 27. Februar 2013

genehmigt: 22. Mai 2012

---

---

## Danksagung

---

Die vorliegende Dissertation wurde im Fachbereich Biologie an der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Layer angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Paul G. Layer für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und der ausgezeichneten wissenschaftlichen Betreuung und seiner steten Unterstützung, die er mir und dieser Arbeit entgegengebracht hat. Ich möchte mich im Besonderen für die Freiheit, die er mir während der gesamten Planung und Umsetzung des Forschungsprojektes gewährt hat, bedanken. Diese Freiheit hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit und zur Reifung meiner wissenschaftlichen Arbeit beigetragen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Astrid Vogel-Höpker bedanken. Ohne ihre außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung und ihr umfangreiches methodisches Können hätte diese Dissertation nie in diesem Umfang fertig gestellt werden können. Ihre Initiative hat erst dazu geführt, dass es mir in Kooperation mit dem Labor von Oksana Lockridge möglich war die Bedeutung der Cholinesterasen an Cholinesterase-Knockoutmäusen näher zu untersuchen.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Labors von Oksana Lockridge. Besonders dankbar bin ich vor allem Ellen Duysen, die für mich die Verpaarung, Genotypisierung und die erste Dokumentation der Knockoutmäuse übernommen hat. Ohne die Überlassung der spezifischen chondrogenen Sonden für die *in situ* Hybridisierung von Andrea Vortkamp wäre ein großer Teil der Auswertung der Defekte der Mausmutanten nicht möglich gewesen. Auch dafür möchte ich mich ganz herzlich bei der Arbeitsgruppe von Andrea Vortkamp bedanken.

Ich bedanke mich sehr bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors für die große Hilfsbereitschaft und gute Kollegialität während meiner Doktorandenzeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Wolfgang Schäfer für die Unterstützung bei technischen Problemen, Gesine Bachmann für die Einführung in die Zellkulturtechniken, Jutta

---

Smidek-Huhn und Meike Stotz-Reimers für die Bewältigung des Laboralltags und der Hilfestellung in der Laborlogistik.

Ich möchte auch all meinen Freunden, die mich während des Studiums begleitet haben, für die vielen schönen Stunden und die Unterstützung die ich erfahren durfte, danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle meine lieben Freunde und meine WG-Mitbewohner. Danke für die Ausdauer, die Ruhe und Geduld, die ihr mir entgegen gebracht habt, und dass ihr mir stets zur Seite gestanden und mich immer wieder aufgemuntert habt, wenn es im Leben mal nicht so gelaufen ist, wie man es gerne hätte haben wollen. Vielen Dank auch an Kerstin und Tobi, die mir mit unseren regelmäßigen Kinoabenden immer wieder eine willkommende Ablenkung von der Doktorarbeit gewährt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir das Studieren und den Weg zur Doktorarbeit erst möglich gemacht haben. Vielen Dank, dass ihr mich geboren habt, und dass ihr mir mit all eurer Liebe zur Seite gestanden und mich so aufopferungsvoll unterstützt und motiviert habt. Ganz besonderen Dank gilt auch meinen Geschwistern, Sandy und Michel, für ihr reges Interesse an meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Marco Spieker bedanken, der gerade in den letzten Zügen meiner Doktorarbeit viel Geduld mit mir beweisen musste.

---

## Inhaltsverzeichnis

---

Danksagung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Abstract .....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Das neuronale und nicht-neuronale cholinerge System .....	2
1.1.1 Die Acetyl- und Butyrylcholinesterase .....	3
1.1.2 Verwendung von Acetylcholinesteraseinhibitoren .....	5
1.2 Die embryonale Skelettentwicklung .....	8
1.2.1 Die endochondrale Ossifikation am Beispiel von Röhrenknochen .....	9
1.2.2 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in hyalinem Knorpel .....	19
1.2.3 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im Knochen .....	21
1.2.4 Veränderung der extrazellulären Matrix während der endochondralen Ossifikation ....	22
1.3 Die endochondrale Ossifikation während der embryonalen Skelettentwicklung der Maus ..	23
Zielsetzung .....	26
2 Material und Methoden .....	27
2.1 Material .....	27
2.1.1 Chemikalien .....	27
2.1.2 Enzyme .....	29
2.1.3 Sonden für die in situ Hybridisierung .....	29
2.1.4 Chemikalien für die Zellkultur .....	30
2.1.5 Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die Zellkultur .....	30
2.1.6 Zusammensetzung von Färbelösungen .....	31
2.1.7 Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für in situ Hybridisierung .....	31
2.1.8 Geräte .....	32
2.1.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien .....	34
2.2 Methoden .....	35
2.2.1 Verwendete Tiermodelle .....	35
2.2.1.1 Kultivierung von Hühnerembryonen .....	35
2.2.1.2 Präparation und Manipulation der Hühnerembryonen .....	36
2.2.1.3 Herstellung der High density Mikromasskultur .....	37
2.2.1.4 Kultivierung der Micromasskultur .....	40
2.2.1.5 Verwendete Cholinesterase knockout Mausmutanten .....	41
2.2.2 Histochemische Färbungen .....	43
2.2.2.1 Fixierung der Embryonen nach der Manipulation .....	43
2.2.2.2 Knorpel-Knochen Färbung im Wholemount .....	43

2.2.2.3	Refixierung von überfixiertem Gewebe .....	44
2.2.2.4	Färbung der Cholinesteraseaktivität mittels Karnovsky-Roots im Wholemount ...	44
2.2.2.5	Herstellung von Gefrierschnitten .....	45
2.2.2.6	Hämatoxylin/Eosin-Kombinationsfärbung .....	46
2.2.2.7	Alcianblaufärbung .....	47
2.2.2.8	Alizarinrotfärbung .....	47
2.2.2.9	Alkalische Phosphatase-Färbung .....	48
2.2.2.10	Toluidinblaufärbung .....	49
2.2.3	<i>In situ</i> Hybridisierung .....	49
2.2.3.1	Präparation der Plasmid-DNA: Maxipräparation (alkalische Lyse mit SDS).....	50
2.2.3.2	Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonde .....	51
2.2.3.3	<i>In situ</i> Hybridisierung an Gefrierschnitten .....	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Manipulationen am Modellsystem Huhn.....	54
3.1.1	Räumliches und zeitliches Aktivitätsmuster der AChE während der frühen embryonalen Extremitätenentwicklung .....	54
3.1.2	Manipulation der Hühnerextremität mit PBS-Beads .....	60
3.1.3	Manipulation der Hühnerextremität mit BW284c51 und MAB 304 .....	61
3.2	Phänotypische Charakterisierung der Cholinesterase-Knockout-Mäuse.....	68
3.2.1	Einfluss des Cholinesterase-Knockouts auf die Skelettentwicklung in der Maus .....	71
3.2.1.1	Graduelle Proteoglykandegradation im Brustkorb .....	71
3.2.1.2	Einzelfärbung der Extremitätenknochen der Cholinesterase Knockout Mäuse .....	73
3.2.1.3	Knorpeldegeneration in den Extremitätenknochen der Knockout-Mäuse während der embryonalen Skelettentwicklung .....	76
3.2.1.4	Einfluss des Cholinesterase-Knockouts auf die endochondrale Ossifikation .....	80
3.3	Histochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten der Cholinesterase-Knockoutmäuse.....	83
3.4	Molekulare Analyse der chondrogenen Markergene Col II, Col X, Ihh, MMP-13 und ALP .....	91
3.5	Aufklärung des cholinergen Regulationsmechanismus <i>in vitro</i> .....	95
4	Diskussion.....	102
4.1	Räumliches und zeitliches AChE-Aktivitätsmuster in der frühembryonalen Knorpelanlage .....	102
4.2	<i>In vivo</i> AChE-Inhibition führt zum Verlust der Knochenmineralisierung .....	104
4.3	Die Deletion der Cholinesterasegene führt zu einer Degradation der Knorpelmatrix und zur Runterregulation von chondrogenen Markern .....	107
4.4	Kultivierung der Micromass mit Hühnerserum beeinflusst die räumliche Trennung von Chondrozyten und „Osteoblasten“-ähnlichen Zellen .....	114
4.5	Die Knorpeldegradation in der Chondrogenese wird über das nicht-neuronale cholinerge System reguliert .....	118
4.6	Modell zur Regulation der Chondrogenese durch den ACh/AChE Feedback-Loop .....	120
4.7	Rolle der AChE in der Apotoseregulation der frühembryonalen Knorpelanlagen, der Gelenkregionen und der Zwischenfingerbereiche .....	122
5	Literaturverzeichnis .....	CXXV
	Ehrenwörtliche Erklärung .....	CXLI

---

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Reizübertragung in der cholinergen Synapse. ....	2
Abbildung 2: Proteinstruktur der AChE und BChE.....	5
Abbildung 3: Chemische Strukturen unterschiedlicher AChE Inhibitoren .....	6
Abbildung 4: Position des BW284c51 Inhibitors innerhalb der aktiven Furche der TcAChE .....	7
Abbildung 5: Ablauf der Skelettentwicklung im Huhn.....	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation .....	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung der molekularen Regulation der Knorpelkondensation .....	11
Abbildung 8: Das Ihh/PTHrP-Signal-System.....	13
Abbildung 9: Übersicht über die Differenzierungsprozesse der mesenchymalen Zellen .....	15
Abbildung 10: Theoretisches Modell für den asymmetrischen Differenzierungsweg von Chondrozyten .....	18
Abbildung 11: Schematische Darstellung der extrazellulären Knorpelmatrix.....	20
Abbildung 12: Darstellung der ECM-Veränderung während der einzelnen Schritte der Chondrogenese.....	23
Abbildung 13: Übersicht über die embryonale Knorpel- und Knochenentstehung in der Wildtypmaus .....	24
Abbildung 14: Überblick über die Lokalisation der Chondrozyten im histologischen Schnitt .....	25
Abbildung 15: Öffnung und Manipulation eines Hühnerembryos <i>in ovo</i> .....	37
Abbildung 16: Differenzierungsprozesse in der Micromass-Kultur imitieren die endochond. Ossifikation.....	38
Abbildung 17: Räumliches und zeitl. AChE-Aktivitätsmuster in der frühen Extremitätenentwicklung.....	55
Abbildung 18: Räumliches und zeitl. AChE-Aktivitätsmuster an Gefrierschnitten der Stadien HH 20-29 .....	57
Abbildung 19: AChE Aktivität in den Gelenkregionen der Finger .....	58
Abbildung 20: AChE-Aktivität in den Zwischenfingerbereichen der Hinterextremität.....	59
Abbildung 21: Knorpel-Knochen Färbung eines mit 1x PBS behandelten Hühnerembryos .....	60
Abbildung 22: AChE-Inhibition durch BW284c51-getränkten Bead .....	62
Abbildung 23: Knorpel-Knochen-Färbung eines mit BW284c51 und MAB 304 behandelten Hühnerembryos ...	64
Abbildung 24: Übersicht über den Phänotyp der Cholinesterase Knockout Mäuse .....	69
Abbildung 25: Darstellung der Gewichtszunahme während der Embryonalentwicklung der Mutanten.....	70
Abbildung 26: Veränderter Knorpelmatrixabbau im Brustkorb der verschiedenen Maus-Mutanten zu P0 .....	72
Abbildung 27: Detailaufnahme der Wirbelknochen zeigt defekten Knorpelabbau in der Doppelmutante .....	73
Abbildung 28: Knorpel-Einzelfärbung zeigt Degradation der Knorpelmatrix in der Cholinesterase .....	74
Abbildung 29: Knorpel-Einzelfärbung zeigt Degradation der Knorpelmatrix in den Cholinesterase Einzel-.....	75
Abbildung 30: Knorpel/Knochenfärbung der Extremitäten aller untersuchten Mutanten im Überblick.....	77
Abbildung 31: Knorpel-/Knochenfärbung der Wildtyp- und Cholinesterase Doppel-Knockout Maus .....	81
Abbildung 32: Gliederung der Wachstumsfuge der Cholinesterasemutanten im Vergleich zum Wildtyp .....	84

---

---

Abbildung 33: Alcianblaufärbung bei pH 2.5 und pH 1.0 zeigt veränderte PG-Verteilung in den Mutanten .....	86
Abbildung 34: Histochemischer Nachweis von GAGs und ALP-Aktivität in den ChE-Mutanten zu P0 .....	89
Abbildung 35: Expression von Col II, Col X, Ihh und MMP-13 in den Cholinesterasemutanten zu P0.....	92
Abbildung 36: Zugabe von 2% CS führt in div 13 zur räumlichen Trennung der Knorpel- und Knochenzellen ..	96
Abbildung 37: AChE Inhibition führt in der <i>in vitro</i> Micromasskulturen zur Knorpeldegradation.....	98
Abbildung 38: Nicotinbehandlung führt in der <i>in vitro</i> Micromasskulturen zur Knorpeldegradation .....	99
Abbildung 39: MLA-Behandlung kann Nicotin-bedingter Knorpeldegradation entgegenwirken .....	100
Abbildung 40: Hühnerserum bewirkt eine räuml. Trennung von chondrogenen und kalzifizierten Zellen .....	115
Abbildung 41: Modell für die cholinerge Regulation der Chondrozytendifferenzierung und Hypertrophie.....	121
Abbildung 42: Schematischer Ablauf einer embryonalen Gelenkentwicklung .....	123



---

## Abkürzungsverzeichnis

---

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Å	Ångström
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholinrezeptor
ALP	Alkalische Phosphatase
AK	Antikörper
ATC	Acetylthiocholiniodid
BChE	Butyrylcholinesterase
bp	Basenpaare
BW284c51	1,5-bis-(4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-one dibromide
bzw.	beziehungsweise
CAS	katalytische anionische Seite
ChAT	Cholinacetyltransferase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dest.	destilliert
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
div	days in vitro (Kulturtage)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Embryonaltag
ECM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm
GAGs	Glykosaminglykane
h	Stunde
iso-OMPA	Tetraisopropylpyrophosphoramide
kb	Kilobasenpaare
M	molar
min	Minute
mL	Milliliter
MLA	Methyllycaconitine
mRNA	messenger RNA
µL	Mikroliter
OT	Objektträger
PAS	periphere anionische Seite
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH	potentia hydrogenii
PG	Proteoglykane
PZ	progress zone
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
VACHT	vesikulärer Acetylcholintransporter
ZNS	zentrales Nervensystem

---

## Abstract

---

Gerade in den letzten Jahrzehnten hat das nicht-neuronale cholinerge System stark an Bedeutung dazugewonnen. Dafür verantwortlich ist vor allem die Tatsache, dass Acetylcholin und seine Rezeptoren bereits in einer Vielzahl nicht-neuronaler, tierischer und humanen Zellen nachgewiesen werden konnte, wo diesem System eine Rolle an der Regulation von Zellfunktionen wie dem Zellwachstum oder der Differenzierung zugeschrieben wird. Darüber hinaus zeigt auch die Acetylcholinesterase Funktionen, die nichts mit der klassischen Funktion in der Termination der Neurotransmission zu tun haben.

Bereits vor 40 Jahren zeigten die Arbeiten von Drews, Falugi und Alber an histochemischen Färbungen der Hühnerextremität, dass die Cholinesterasen schon während der frühen Skelettentwicklung in den Knochenstrukturen aktiv sind (Drews, 1972; Falugi et al., 1985; Alber et al., 1994). Neuere Studien weisen darauf hin, dass einige Komponenten des cholinergen Systems während der Chondrozyten- und Osteoblastendifferenzierung *in vitro* hochreguliert werden und darüber hinaus an der Regulation von chondrogenen Markern beteiligt zu sein scheinen (Sato et al., 2010). Bisher ist jedoch noch nichts darüber bekannt inwiefern das nicht-neuronale cholinerge System an der Regulation der endochondralen Ossifikation involviert ist.

Ziel dieser Doktorarbeit ist es die Acetylcholinesterase, als einen Teil des nicht-neuronalen cholinergen Systems, während der frühen Skelettentwicklung genauer zu untersuchen. Die hierzu durchgeführte Aktivitätsstudie zeigt, dass die Acetylcholinesterase bereits während der frühen Aggregationsprozesse der Knorpelanlage stark in den Chondroblasten exprimiert ist, jedoch mit zunehmender Differenzierung in den Chondrozyten verschwindet. Erst in den späteren Entwicklungsstadien zeigt sich wieder eine gesteigerte Acetylcholinesterase-Aktivität in den Osteoblasten. Um die Bedeutung der AChE in den frühen Prozessen der Chondrogenese näher untersuchen zu können, wurden *in vivo* und *in vitro* Inhibitionsprozesse am Modellsystem Huhn durchgeführt. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Inhibition der AChE während der frühen Aggregationsprozesse *in ovo* zu einem Verlust der Mineralisierung der späteren Ossifikationszentren in den betroffenen Skelettstrukturen der Hühnerflügel führt. Die Verwendung unterschiedlicher Inhibitoren hat dabei ergeben, dass der beobachtete Effekt nicht auf die Funktion der AChE als Zelladhäsionsmolekül zurückzuführen ist, sondern mit der klassischen enzymatischen Funktion dieses Enzyms im Zusammenhang zu stehen scheint.

---

Diese Beobachtung stärkt die Vorstellung, dass die Skelettogenese über das nicht-neuronale cholinerge System reguliert zu sein scheint.

Weitere Erkenntnisse über die Funktion der Cholinesterasen während der Skeletogenese sollten zusätzliche Untersuchungen an drei verschiedenen Cholinesterase-Knockout-Mutanten, der AChE-Knockout-, der BChE-Knockout- und der AChE/BChE-Doppel-Knockout-Mutante, liefern. Die unterschiedlichen Mausmutanten wurden in einem ersten Schritt auf ihre Knorpeldifferenzierung und die Mineralisierung der Ossifikationszentren hin untersucht. Hierbei zeigen alle Mutanten im Vergleich zur Wildtypmaus eine deutlich verfrühte Entwicklung der gesamten Skelettstrukturen. Nähere Untersuchungen haben ergeben, dass sowohl die BChE-Mutante als auch die Doppel-Knockout-Maus eine deutlich verfrühte Mineralisierung der Ossifikationszentren aufweisen. Besonders auffällig war bei den Mutanten, dass das Fehlen der Cholinesterasen während der späteren Differenzierungsprozesse der Chondrozyten zu einem Verlust der typischen Proteoglykane der Knorpelmatrix führt. Zu P0 kann in keiner Mutante mehr eine Knorpelmatrix in den ruhenden, den proliferierenden oder den prä-hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden. Lediglich die hypertrophen Chondrozyten scheinen von diesem Verlust unbeeinflusst zu sein. In der Doppel-Knockout-Maus findet sich darüber hinaus auch eine Deslokation der Knorpelmatrix. Zum Entwicklungsstadium P0 tritt in dieser Mausmutante eine zusätzliche Proteoglykanfärbung in den primären Ossifikationszentren der Extremitätenknochen auf.

Anhand von *in situ* Hybridisierungen wurden die Expressionsmuster typischer chondrogener Marker während der Skeletogenese in den verschiedenen Cholinesterase-Mutanten näher untersucht. Hierbei hat sich gezeigt, dass Kollagen Typ II, welches hauptsächlich von proliferierenden Chondrozyten exprimiert wird, in der Doppel-Knockout Maus eine zusätzliche Expression in den Zellen entlang des Perichondriums aufweist. Die Marker für prä-hypertrophe bzw. hypertrophe Chondrozyten wie zum Beispiel Ihh-, das Kollagen Typ X und MMP-13 sind im Gegensatz dazu stark herunter reguliert. Darüber hinaus zeigen alle Mausmutanten zu P0 einen vollständigen Verlust der alkalischen Phosphatase-Aktivität.

In darauf aufbauenden *in vitro* Studien wurde mit Hilfe des *high density* Micromass-Kultursystems versucht durch veränderte Kulturbedingungen der *in vivo* Situation der Knockoutmäuse möglichst nahe zu kommen. Hierbei sollten insbesondere auch andere Komponenten des nicht-neuronalen cholinergen Systems wie zum Beispiel das Acetylcholin oder seine Rezeptoren in Hinsicht auf die Regulation der Chondrogenese näher untersucht werden.

---

In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Acetylcholinesterase während der späteren Differenzierungsprozesse *in vitro* zu einem konzentrationsabhängigen Verlust der typischen Proteoglykane der Knorpelmatrix und der alkalischen Phosphatase Aktivität führt. Interessanterweise werden jedoch die gleichen Effekte auch durch die Behandlung mit Nikotin erzielt. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Inhibition der Acetylcholinesterase als sekundären Effekt zu einer Erhöhung des ACh-Spiegels führt. Um zu klären, inwiefern die Acetylcholinrezeptoren an der Regulation dieser Effekte beteiligt sind, wird in einem weiteren Versuch parallel zur Nikotinbehandlung der nikotinische Acetylcholinrezeptoren spezifisch inhibiert. Hierbei wurde beobachtet, dass der Verlust der Proteoglykane und der alkalischen Phosphatase Aktivität konzentrationsabhängig entgegengewirkt werden kann.

Die im Laufe dieser Arbeit zusammengetragenen Daten lassen in Verbindung mit den bereits zu diesem Thema veröffentlichten Studien die Vermutung zu, dass die Chondrogenese zu einem Teil über nicht-neuronale cholinerge Regulationsmechanismen reguliert wird. Hierbei fördert das von den Chondrozyten sekretierte Acetylcholin über die nikotinischen Chondrozyten in den ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten die Proliferation. Solange das Acetylcholin die Acetylcholinrezeptoren in den Chondrozyten aktiviert, wird die Differenzierung gehemmt und die Expression von chondrogenen Markern wie Ihh, MMP-13 und die alkalische Phosphatase inhibiert. Durch einen noch unbekannten Mechanismus wird in den hypertrophen Chondrozyten vermehrt die Acetylcholinesterase produziert. Parallel dazu nimmt die Expression der Acetylcholinrezeptoren in den terminalen hypertrophen Chondrozyten ab. Die von den hypertrophen Chondrozyten produzierte Acetylcholinesterase diffundiert in den Bereich der prä-hypertrophen Zone und spaltet dort das Acetylcholin, was zu einer Termination der Signaltransduktion an den Acetylcholinrezeptoren führt. Die Hemmung der chondrogenen Marker wie Ihh, MMP-13 und der alkalischen Phosphatase wird aufgehoben und die Chondrozyten werden in die Lage versetzt zu hypertrophieren.

Um die Rolle des nicht-neuronalen cholinergen Systems während der Skelettogenese eindeutig klären zu können sind noch weitere *in vivo* Studien notwendig. Zudem sollte in diesem Zusammenhang auch vermehrt auf die Bedeutung von toxischen cholinergen Faktoren wie dem Nikotin oder den Organophosphaten, die in die frühe Regulation dieses Systems eingreifen können, eingegangen werden.

---

# 1 Einleitung

---

Seit der Entdeckung des cholinergen Systems vor fast 100 Jahren durch Otto Loewi und Sir Henry Dale widmet sich eine Vielzahl von Forschern der Aufklärung der cholinergen Funktionen. Die Arbeiten der letzten Jahrzehnte zeigen, dass mehrere Komponenten des cholinergen Systems an Regulations- und Entwicklungsprozessen beteiligt zu sein scheinen, die in keinem Zusammenhang zur klassischen Funktion in der Neurotransmission stehen. Bereits in den 90er Jahren konnte an histochemischen Färbungen nachgewiesen werden, dass Cholinesterasen bereits während der frühen Skelettentwicklung in den Knochenstrukturen aktiv sind (Falugi et al., 1985; Alber et al., 1994). In einer aktuellen Zellkulturstudie wurde darüber hinaus gezeigt, dass einige Komponenten des cholinergen Systems während der Osteoblastendifferenzierung *in vitro* hochreguliert werden. Zusätzlich scheint das Acetylcholin auch an der Proliferation und der Differenzierung von Osteoblasten beteiligt zu sein (Sato et al., 2010).

Die Tatsache, dass Komponenten des cholinergen Systems sowohl während der frühen embryonalen Skelettentwicklung als auch der späteren Osteoblastendifferenzierung *in vitro* nachgewiesen werden können, lässt die Frage aufkommen, ob das cholinerge System bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des Skelettsystems eine Rolle spielen könnte.

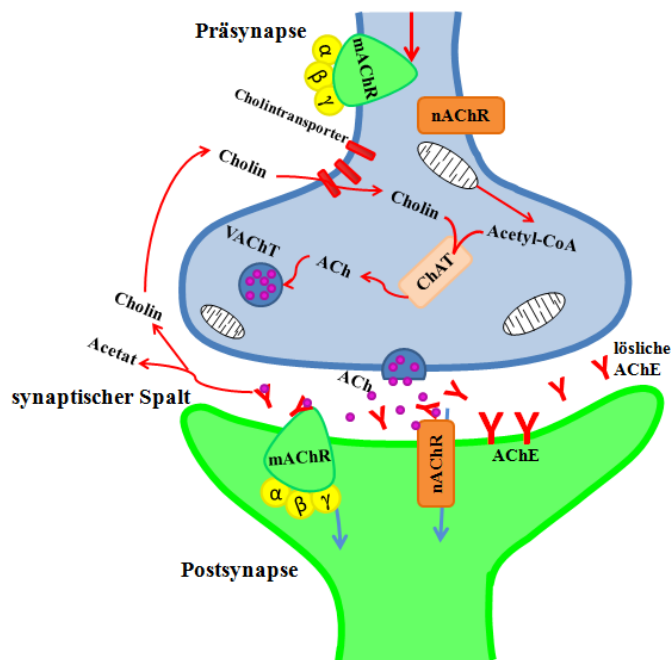
Ziel dieser Arbeit ist es daher das Expressionsmuster der Acetylcholinesterase, als einem Schlüsselement des nicht-neuronalen cholinergen Systems während der frühen embryonalen Skelettentwicklung aufzuklären und ihren Einfluss auf die embryonale Skelettentwicklung näher zu untersuchen.

---

## 1.1 Das neuronale und nicht-neuronale cholinerge System

---

Die Entdeckung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh), der 1926 durch Loewi noch als Vagus-Substanz beschrieben wurde, brachte ihm und Sir Henry Dale 1936 den Nobelpreis ein und eröffnete damit das Feld der cholinergen Forschung. Unter dem klassischen neuronalen cholinergen System versteht man Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems, die den Neurotransmitter Acetylcholin freisetzen bzw. mit den Acetylcholinrezeptoren auf diesen Neurotransmitter reagieren (Neuhuber, 2004). Das cholinerge System umfasst alle nötigen Komponenten für die Reizübertragung mittels Acetylcholin, wie die Acetylcholinrezeptoren (AChR), die Cholinacetyltransferase (ChAT) und den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT). Acetylcholin wird mit Hilfe des Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-CoA und Cholin im Cytoplasma cholinergischer Neurone zusammengesetzt und von dort aus mit Hilfe des vesikulären Acetylcholintransporters (VACHT) zur präsynaptischen Membran der Nervenendigung transportiert. VACHT fusioniert anschließend mit der präsynaptischen Membran und entlässt ACh in den synaptischen Spalt, wo es durch den synaptischen Spalt diffundiert und an den Rezeptoren der postsynaptischen Membran bindet (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Reizübertragung in der cholinergen Synapse.**

Dargestellt ist das Schemabild einer cholinergen Synapse. Der Neurotransmitter ACh wird im Cytoplasma durch das Enzym ChAT aus Cholin und Acetyl-Co gebildet und in Vesikeln (VACHT) verpackt. Durch einen ankommenden elektrischen Reiz ausgelöst wandern die VACHT zu präsynaptischen Membran, fusionieren mit ihr und entlassen ACh in den synaptischen Spalt. ACh bindet an mACHR oder nACHR der Postsynapse und vermitteln so die Reizweiterleitung. Die Neurotransmission wird durch lösliche oder membrangebundene AChE durch die Spaltung des Acetylcholins in Cholin und Acetat beendet.

---

Man unterscheidet hierbei zwei verschiedene Rezeptortypen, die nikotinischen, die sich im ZNS und in Ganglien des Parasympathikus und des Sympathikus befinden, und die muskarinischen Rezeptoren, die sich ebenfalls im ZNS, aber auch in den Effektororganen des Parasympathikus befinden. An Synapsen mit nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) wird die Neurotransmission durch einen Kationeneinstrom in die postsynaptische Nervenzelle vermittelt (siehe Abbildung 1). Bindet der Neurotransmitter jedoch an den muskarinischen Rezeptor (mAChR), wird die Reizweiterleitung durch eine Kaskade von Second-messenger Systemen in Gang gesetzt (Zenker, 1994).

In den letzten Jahrzehnten wurden die unterschiedlichen Komponenten des cholinergen Systems auch in Geweben nachgewiesen, die keine neuronale Innervation erfahren. Diese Beobachtung hat einen neuen Begriff des sogenannten „nicht-neuronalen cholinergen Systems“ geprägt. So wurde zum Beispiel Acetylcholin bereits außerhalb des Tierreiches in Bakterien, Pilzen und primitiven Pflanzen (Wessler et al., 2001) und bei einer Vielzahl von nicht-neuronalen, humanen Zellen nachgewiesen (Wessler et al., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieses nicht-neuronalen cholinerge System in den unterschiedlichen Geweben an der Regulation von Zellfunktionen wie zum Beispiel dem Zellwachstum oder der Differenzierung beteiligt ist (Wessler et al., 2003). Darüber hinaus ist besonders die Acetylcholinesterase für die Begünstigung des Neuritenwachstums (Layer et al., 1993; Sternfeld et al., 1998), der Beteiligung an apoptotischen Prozessen (Ye et al., 2010; Jin et al., 2004; Jiang et al., 2008) und wegen der Homologie zu Zelladhäsionsmolekülen (Paraoanu et al., 2005; Paraoanu et al., 2008; Johnson et al., 2004) bekannt geworden.

---

### **1.1.1 Die Acetyl- und Butyrylcholinesterase**

---

Seit mehr als 90 Jahren gilt das Interesse der Wissenschaftler der Erforschung der Cholinesterasen. Dank der intensiven Forschung ist bereits sehr viel über die Struktur, Aktivität und Expression von Cholinesterasen bekannt und sie gehört damit wohl zu den am Besten studierten Enzymen.

Cholinesterasen sind Prototypen hydrolytischer Enzyme, die einen Serin-Rest am katalytischen Zentrum (Serin-Hydrolasen) nutzen. Die Cholinesterasen gehören zu einer Familie von Enzymen, die Cholinester hydrolysieren. Diese Familie ist in die Acetylcholinesterase (AChE) und die Butyrylcholinesterase (BChE) (siehe Abbildung 2),

---

oder Pseudocholinesterase unterteilt. Die beiden Proteine AChE und BChE stimmen in etwa 50% ihrer Sequenz überein, werden jedoch durch zwei getrennte Gene codiert (Legay, 2000). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen der AChE und der BChE besteht in ihrem Aufbau aus einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt (Darvesh et al., 2003), welches von mehreren  $\alpha$ -Helices umgeben ist (siehe Abbildung 2).

Die Unterscheidung der beiden Cholinesterasen AChE und BChE erfolgt über ihre relativen Fähigkeiten, unterschiedliche Cholinester zu hydrolysieren. AChE ist in der Lage, ACh sehr spezifisch zu spalten, andere Alkylester wie zum Beispiel Butyrylcholin können durch AChE weniger gut gespalten werden. Im Gegensatz dazu weist BChE eine geringere Substratspezifität auf, womit es in der Lage ist, neben ACh auch viele andere Alkylcholinester, Kokain, Acetylsalicylsäure oder Succinylcholin (Darvesh, 2003) zu hydrolysieren.

Neben der unterschiedlichen Substratspezifität unterscheiden sich die beiden Cholinesterasen auch in der Inhibitorsensitivität. Inhibitoren wie BW284c51 oder Donepezil sind für AChE spezifisch, während iso-OMPA und Ethopropazine für BChE spezifisch sind. Diese Unterschiede spiegeln die molekulare Struktur der beiden Enzyme wieder. Die selektive Inhibition der BChE durch iso-OMPA, ein Organophosphat, wird durch die spezifische Bindung an der großen Acyl-Tasche in der aktiven Furche der BChE vermittelt und führt infolge dessen zu einer Inhibition der Esteraseaktivität. Iso-OMPA wirkt deshalb so spezifisch, da die Acyl-Tasche am Boden der Furche der AChE kleiner ist und diese somit iso-OMPA nicht binden kann.

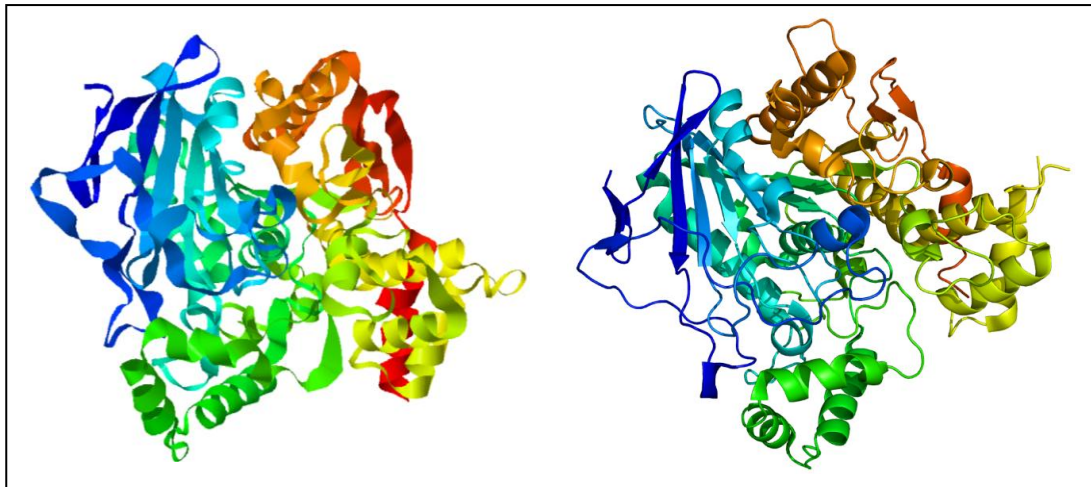
Die Acetylcholinesterase ist überwiegend im synaptischen Spalt lokalisiert, wo sie an ein Netzwerk aus Kollagen und Glykosaminoglykanen, das von den postsynaptischen Zellen stammt, gebunden ist. In der Neurotransmission ist die AChE als das Enzym bekannt, das die Aktion des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) an cholinergen Synapsen beendet. In den letzten fünfzehn Jahren zeigen jedoch mehrere wissenschaftliche Arbeiten, dass die AChE zusätzlich Funktionen bei der Zelldifferenzierung, der Synaptogenese und verschiedenen degenerativen Erkrankungen haben könnte, die nicht in Verbindung zur Hydrolyse von ACh stehen. Diese „nicht-klassischen“ Funktionen sind bereits gut dokumentiert, der Mechanismus, der diese Funktionen unterstützt, ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Im Vergleich zur AChE kommt die BChE im menschlichen Körper in einer etwa 10fach höheren Konzentration vor. Die BChE kann als Protein oder mRNA in fast allen Geweben



---

des Körpers nachgewiesen werden (Masson, 2010), unter anderem auch während der frühen Skelettentwicklung im Knochenschaft von Hühnern (Alber et al., 1994).



**Abbildung 2: Proteinstruktur der AChE und BChE**

Dargestellt ist die schematische Abbildung der Proteinstrukturen der AChE (links) des *Torpedo californica* und der humanen BChE (rechts). Durch die farbige Darstellung sind deutlich die strukturellen Homologien der beiden Enzyme zu erkennen.  
Quelle: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein\\_BCHE\\_PDB\\_1p0i.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_BCHE_PDB_1p0i.png)

Die BChE zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sie neben der Esteraseaktivität auch eine Aryl-Acylamidase- und eine Peptidase-Aktivität aufweist. Trotz der vielfältigen reaktiven Zentren der BChE bleibt die physiologische Bedeutung dieses Enzyms bis heute weitgehend unbekannt, da Mutationen des BChE-Gens im Menschen keinen offensichtlichen Auswirkungen z.B. auf die physiologischen Prozesse im Gehirn oder der Leber ausüben (Mack et al., 2000; Chatonnet et al., 1989).

---

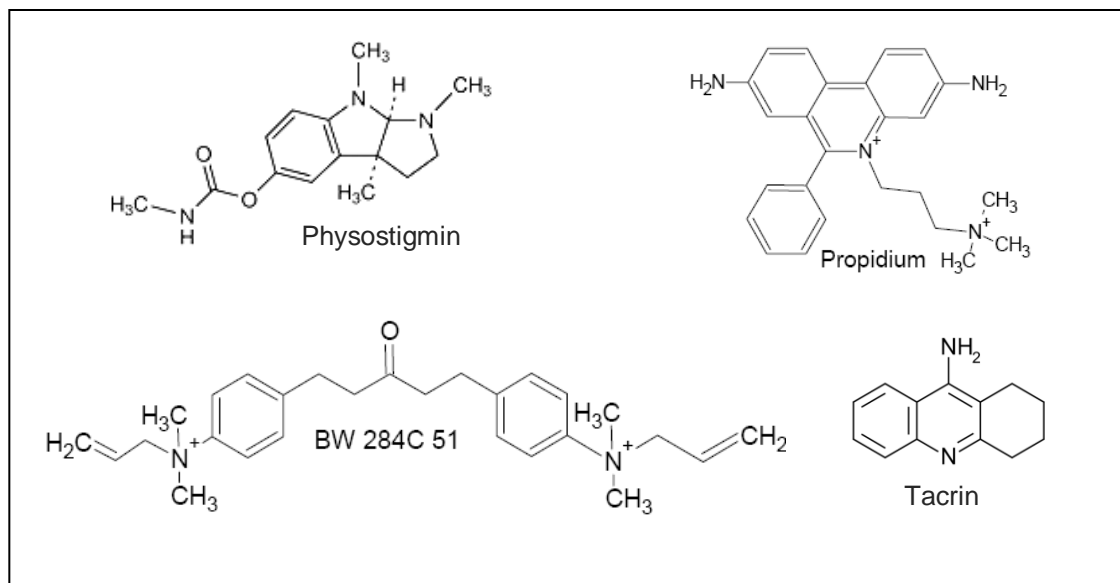
### 1.1.2 Verwendung von Acetylcholinesteraseinhibitoren

---

Aufgrund der umfangreichen physiologischen, pharmakologischen und toxikologischen Bedeutung der Acetylcholinesterase (AChE) wird bis heute sehr intensiv nach potenten Inhibitoren geforscht. Die unterschiedlichen AChE-Inhibitoren können entsprechend ihrer Bindungsmotive die Wirkung der AChE auf drei verschiedene Arten blockieren. Dementsprechend unterscheidet man die Inhibitoren des aktiven Zentrums („catalytic anionic site“, CAS), die Inhibitoren der peripheren Bindungsstelle („peripheral anionic site“, PAS) und die „dualbindenden“ Inhibitoren.

Bei den Inhibitoren, die mit dem aktiven Zentrum wechselwirken, handelt es sich entweder um nicht-kovalente Liganden (z.B. Tacrin) oder um „Substrate“, die das Serin der

katalytischen Triade carbamylieren (z.B. Physostigmin) (siehe Abbildung 3) und so die enzymatische Aktivität der AChE blockieren. Andere Inhibitoren, wie Propidium (siehe Abbildung 3) oder Fasciculin binden bereits an der PAS am Eingang der Furche, wodurch die Substratbindung für ACh stark herabgesetzt wird (Szegetes et al., 1998). Die PAS der AChE ist in vorhergehenden Arbeiten auch als Bindedomäne für extrazelluläre Matrixproteine identifiziert worden, was dazu führt, dass bei einer Inhibitorbindung der PAS auch die Funktion als Zelladhäsionsmolekül dementsprechend herabgesetzt wird (Johnson et al., 2003; Paroanu et al., 2005).



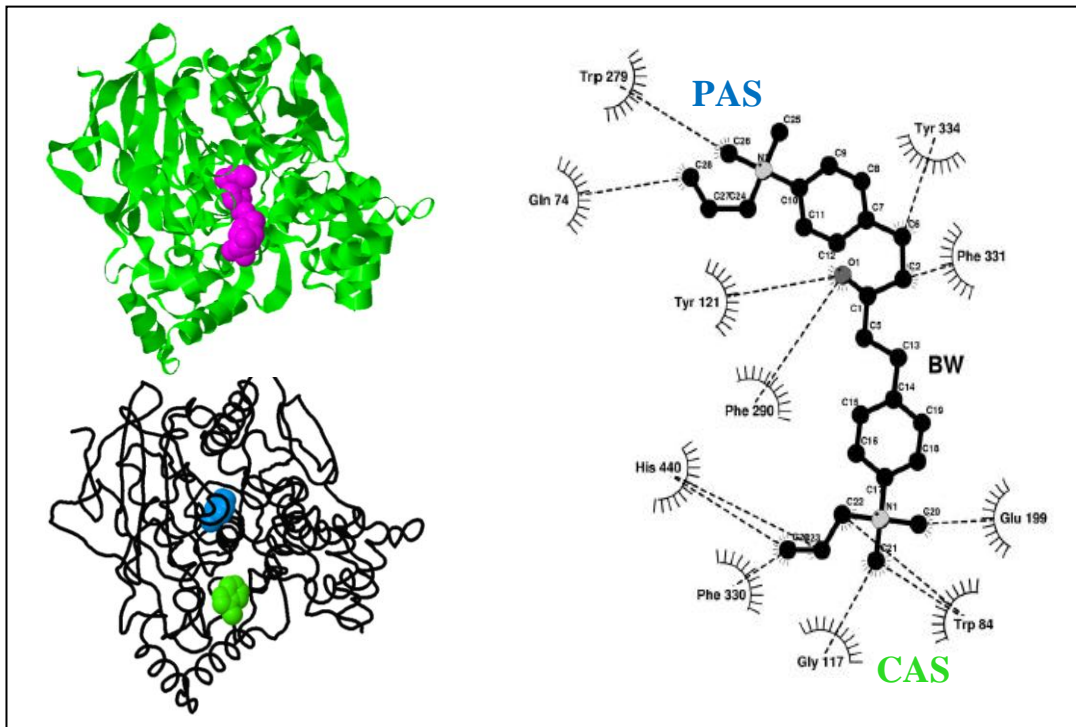
**Abbildung 3: Chemische Strukturen unterschiedlicher AChE Inhibitoren**

In der vorliegenden Arbeit sind für die irreversible Inhibition der AChE der „dualbindende“ BW284c51 Inhibitor (BW) und der peripher bindende AChE-Antikörper MAB 304 ausgewählt worden.

Wie die meisten bivalenten AChE Inhibitoren (AChEI), interagiert 1,5-bis(4-allyl-dimethylammonium-phenyl)-pentan-3-one dibromide, BW284c51 (BW) sowohl mit der CAS als auch mit der PAS und unterbindet damit sowohl die Enzymaktivität als auch die Funktion als Zelladhäsionsmolekül (siehe Abbildung 4) (Felder et al., 2002).

Bei dem zweiten verwendeten Inhibitor handelt es sich um den AChE-Antikörper Mab 304. Dieser Antikörper wurde bereits 1982 von Fambrough und Rosenberry (Fambrough et al., 1982) verwendet, um Homologien zwischen der Acetylcholinesterase der Erythrozyten und der neuromuskulären Endplatte näher zu untersuchen. Bereits in dieser frühen Arbeit konnte

gezeigt werden, dass MAB 304 spezifisch an die AChE bindet, die katalytische Aktivität davon jedoch unbeeinflusst bleibt.



**Abbildung 4: Position des BW284c51 Inhibitors innerhalb der aktiven Furche der TcAChE**

Gezeigt ist die Proteinstruktur der AChE von *Torpedo californica* TcAChE (links oben und unten) mit dem katalytischen Zentrum (CAS; grün) und der peripheren anionischen Bindedomäne (PAS; blau) (unten). In der linken oberen Abbildung ist das Bindemotiv des BW284c51 Inhibitors über beide Zentren hinweg dargestellt (BW284c51; rosa). Die Position des BW-Inhibitors innerhalb der aktiven Furche der AChE ist in Form eines schematischen Diagramms (rechts) mit den Atom-Atom Kontakten des BW-Inhibitors und den angrenzenden Aminosäureresten der PAS und CAS dargestellt. Die katalytische Domäne (CAS, grün), beinhaltet die Aminosäurereste Trp84 und Phr330, während die periphere Domäne (PAS, blau) am Eingang der Furche, die Aminosäurereste Trp279 und Tyr 121 enthält. Die periphere Domäne sorgt neben seiner Funktion als Zelladhäsionsdomäne für die „Prä-bindung“ der Substrate und hilft diese zum aktiven Zentrum im Innern der Furche zu dirigieren (Quelle links: <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/1e3q>; rechts: Felder et al., 2002).

In einer späteren Arbeit verwendeten Sharma und Bigbee diesen Antikörper, um den Einfluss der AChE auf das Adhäsionsverhalten und das Neuritenwachstum von neuronalen Zellen näher zu untersuchen (Sharma und Bigbee, 1998). In dieser Studie konnten sie zeigen, dass die Inhibition der AChE mit MAB 304 zwar keinen Einfluss auf die enzymatische Funktion der Esterase hat, die neuronalen Zellen jedoch ein deutlich vermindertes Adhäsionsverhalten und Neuritenwachstum aufzeigen. Heute weiß man, dass diese Funktion der AChE über die PAS vermittelt wird. In der vorliegenden Doktorarbeit soll durch die Verwendung dieses Antikörpers untersucht werden, ob der Einfluss der Cholinesterasen in der Skelettentwicklung von der Fähigkeit der AChE extrazelluläre Matrixproteine binden zu können abhängt oder über die klassische Funktion, ACh hydrolysieren zu können, reguliert wird.

---

## 1.2 Die embryonale Skelettentwicklung

---

Das Wirbeltierskelett ist ein sehr komplexes Organ, welches sich aus einer Vielzahl von Knochen, die sich in ihrer Größe, Form und Lage voneinander unterscheiden, zusammensetzt. Grundsätzlich unterteilt sich das Skelett in das Achsenskelett, welches den Schädel, das Zungenbein, das Brustbein, die Rippen und die Wirbelknochen beinhaltet, und das periphere Skelett, welches die Knochen der Extremitäten und des Beckens umfasst.

Während der Embryonalentwicklung gehen die einzelnen Knochen des Skeletts aus mesodermalen Zellen hervor, die ihren Ursprung in drei unterschiedlichen embryonalen Vorläuferzellen haben (Karsenty, 1998). So gehen die Knochen des Schädelskeletts aus den Zellen der Neuralleiste, das Achsenskelett aus den Sklerotomzellen der Somiten und das Extremitätenskelett aus dem lateralen Plattenmesoderm hervor. An der Entstehung und Aufrechterhaltung des Wirbeltierskeletts sind im Besonderen drei verschiedene Zelltypen, die Chondrozyten, die Osteoblasten und die Osteoklasten beteiligt. Die Chondrozyten sind maßgeblich am Knorpel-, und die Osteoblasten am Knochenaufbau beteiligt, während die Osteoklasten die Knochensubstanz resorbieren und dadurch einen wichtigen Antagonismus zur Knochenbildung darstellen. Über die Differenzierung dieser drei Zelltypen werden das Wachstum und die Homöostase des Knorpels und Knochens gesteuert.

In höheren Vertebraten kann die Knochenbildung während der Embryonalentwicklung durch zwei sehr unterschiedliche Mechanismen, die desmale und die endochondrale Ossifikation, erfolgen.

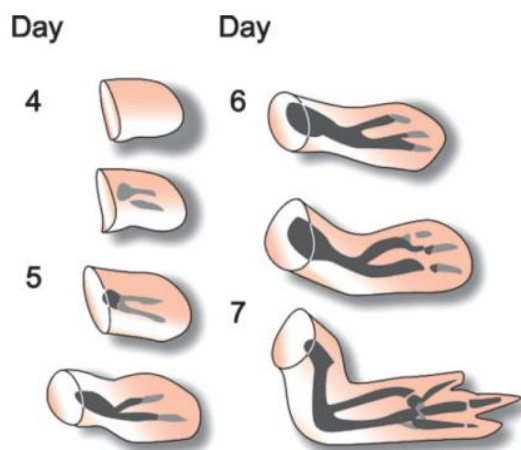
Bei der desmalen Ossifikation (intramembranous ossification), die auf einen kleinen Teil des Skeletts, wie z.B. Teile des Schädels, der Gesichtsknochen und des Schlüsselbeins, beschränkt ist, differenzieren die mesenchymalen Vorläuferzellen nach der Kondensation direkt in Osteoblasten, welche die Knochenmatrix sekretieren. In den meisten Elementen des Skeletts, wie z.B. dem Achsenskelett und dem Extremitätenskelett erfolgt die Knochenbildung jedoch durch die endochondrale Ossifikation, einem mehrstufigen Prozess, bei dem die mesenchymalen Zellen kondensieren, in Chondrozyten differenzieren und eine Knorpelanlage als Grundlage für den späteren Knochen bilden (Erlebacher et al., 1995; Hall et al., 2000). Anschließend wird diese Knorpelanlage durch die folgende vaskuläre Invasion durch Knochenzellen ersetzt (Gerber et al., 1999; Vu et al., 1998).

---

### 1.2.1 Die endochondrale Ossifikation am Beispiel von Röhrenknochen

---

Bei der endochondralen Ossifikation handelt es sich, anders als bei der desmalen Ossifikation, um einen indirekten Knochenbildungsprozess, bei dem das Skelett zuerst in Form eines hyalinen Knorpels angelegt wird. Diese Knorpelanlage, das sog. Primordialskelett, dient als Gerüst für den zu bildenden Knochen (siehe Abbildung 5). Erst in einem späteren Stadium werden diese Knorpelstrukturen durch Knochenzellen ersetzt (Osteogenese). Da das Primordialskelett die Grundlage für den späteren Knochen bildet, stellt die Chondrogenese in der endochondralen Ossifikation einen entscheidenden Schlüsselprozess dar. Die besondere Bedeutung der hyalinen Knorpelanlage liegt hierbei nicht nur in seiner Bereitstellung eines mechanischen stabilen Gerüsts, sondern auch in seiner Rolle als Quelle des Längen- und Dickenwachstums von Knochen.



**Abbildung 5: Ablauf der Skelettentwicklung im Huhn**

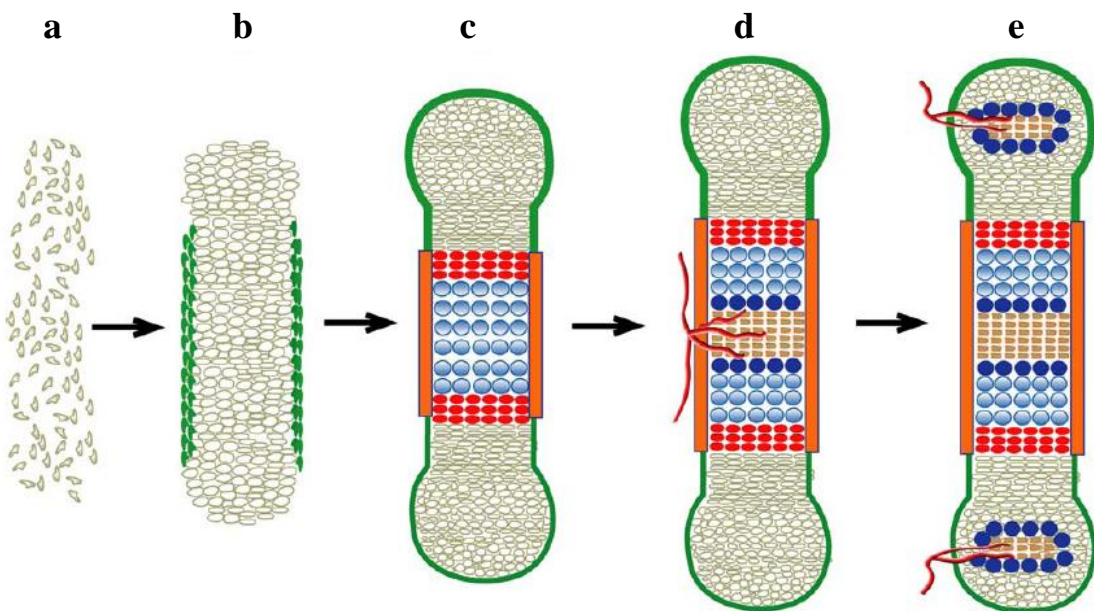
In der Abbildung ist schematisch der Ablauf der Skelettentwicklung zwischen dem Tag 4 und dem Tag 7 der Embryogenese in der Vorderextremität des Hühnchens dargestellt. Die Bereiche der Knorpelvorläuferkonzentration sind grau und die Bereiche des ausgebildeten Knorpels schwarz dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Entwicklung der Skelettelemente einem proximaldistalen Gradienten folgt. Die sich anschließende Verknöcherung der Knochen erfolgt ebenfalls in dieser Reihenfolge (im Schema nicht dargestellt).

(Quelle: Newman et al., 2007)

Die endochondrale Ossifikation der Röhrenknochen wird, wie in Abbildung 6 a-c gezeigt, durch die Chondrogenese eingeleitet. Die Zellen, die für die Bildung der Skelettelemente der Extremitäten verantwortlich sind, stammen ursprünglich aus dem lateralen Plattenmesoderm und wandern im Verlauf der embryonalen Entwicklung in die Extremitätenknospe ein (Erlebacher et al., 1995; Tickle et al., 2001), wo sie anschließend für das Phänomen, welches als „pre-cartilaginous condensation“ (Knorpelvorläuferkonzentration) bekannt ist, verantwortlich sind. Die Knorpelvorläuferkonzentration ist eines der ersten morphologisch sichtbaren Ereignisse der Chondrogenese und wurde 1925 als erstes durch HB Fell beschrieben (DeLise et al., 2000; Hall et al., 2000; Bi et al., 1999). Während dieses Prozesses kondensieren und aggregieren die undifferenzierten mesenchymalen Zellen (Hall et al., 1992; Hall et al., 1995), wodurch sich ihre Zelldichte stark erhöht, ohne dass diese Zellen vermehrt

proliferieren (Thorogood et al., 1975; DeLise et al., 2000). In dieser kurz anhaltenden Phase der embryonalen Skelettentwicklung werden die Knorpelanlagen für die zukünftigen Skelettelemente gebildet und damit die Form, Größe, Position und Anzahl der endochondralen Skelettelemente determiniert (siehe Abbildung 5).

Parallel zur Zunahme der Zelldichte steigen während der chondrogenen Kondensation auch die Zell-Zell-Kontakte durch die vermehrten Adhäsionsmoleküle und die Anzahl an „gap junctions“, welche die interzelluläre Kommunikation und den Transfer von kleineren Molekülen zwischen den Zellen erleichtern (Kelley et al., 1978; Coelho et al., 1991; Cohn et al., 1996).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation**

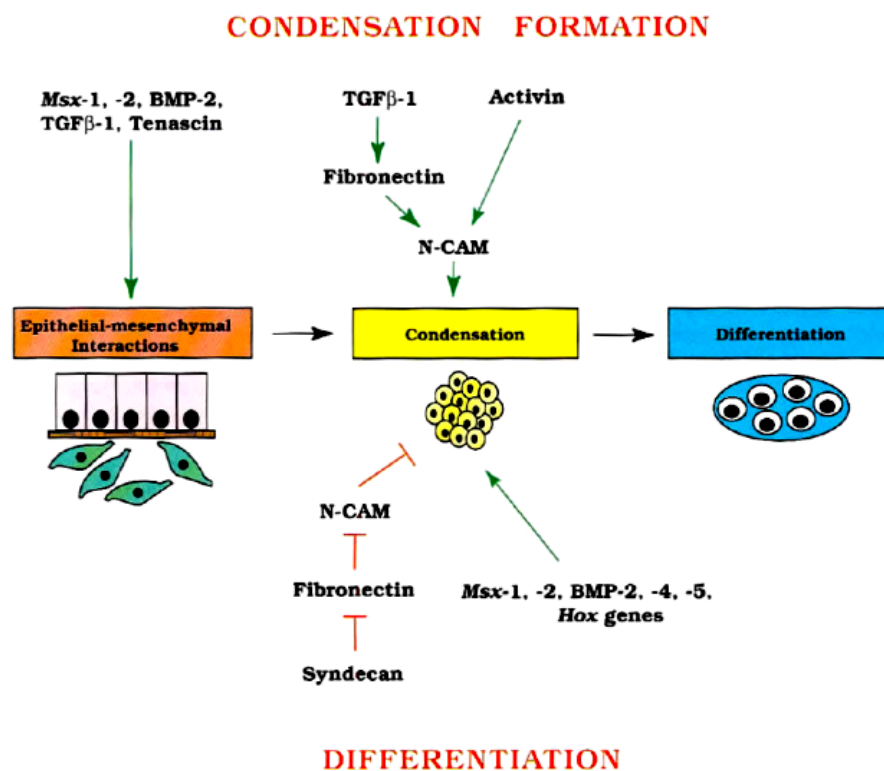
Wie in der Abbildung dargestellt, beginnen die mesenchymalen Zellen zu kondensieren und differenzieren dabei zu Chondroblasten (a). Anschließend werden die Chondroblasten zu Chondrozyten und bilden die sogen. Knorpelanlage, die vom Perichondrium (grün) umgeben ist (b). Im Zentrum der Knorpelanlage hören die Zellen auf zu proliferieren und werden erst prähypertroph (rot) und anschließend hypertroph (blau) (c). Die terminalen hypertrophen Chondrozyten werden apoptotisch (dunkelblau) und bilden Raum für die einwandernden Osteoklasten, die den Abbau der Knorpelmatrix initiieren (braun). Blutgefäße dringen in die Knorpelanlage ein und die Osteoblasten bilden das primäre Ossifikationszentrum. Das angrenzende Perichondrium wird zum Periosteum (orange) (d). Die Chondrozyten verlängern durch andauernde Proliferation den Knochen. Die sekundären Ossifikationszentren und die Knochenmarkhöhle werden gebildet (e).

(Quelle: Wuelling et al., 2010)

Anhand der bisherigen Erkenntnisse geht man davon aus, dass die Kondensation der undifferenzierten mesenchymalen Zellen durch die epithelialen-mesenchymalen Interaktionen (Hall et al., 2000; Tuan, 2004) über einen chemischen Gradienten von bone morphogenetic proteins (BMP's) (Kronenberg, 2003) und Fibronectin (Hall et al., 1992) initiiert und



kontrolliert wird (Hall et al., 2000; Tuan, 2004). Die BMP's induzieren aus dem Epithel heraus (Zouet al., 1997; Thesleff et al., 1996) eine vermehrte Expression von Msx-1,-2 in den mesenchymalen Zellen (Hall et al., 1995; Knothe Tate et al., 2008), welches die chondrogene Kondensation initiiert (siehe Abbildung 7). Seit 1992 weiß man, dass TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) und Fibronectin zusätzlich den Kondensationsprozess unterstützen (Hall et al., 1992). TGF- $\beta$  gehört mit zu den frühesten Signalen der chondrogenen Kondensation und stimuliert die Produktion von Fibronectin, welches seinerseits wiederum in seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül die N-CAM (neural cell adhesion molecule) Akkumulation stimuliert (siehe Abbildung 7). Die Zell-Zell-Kontakte der mesenchymalen Zellen werden hierbei über eine homophile Bindung der N-CAM hergestellt, das bedeutet, dass die N-CAM der einen Zelle direkt an die N-CAM der anderen Zelle binden und dadurch ihren Kontakt herstellen.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der molekularen Regulation der Knorpelkondensation**

Die Knorpelkondensation wird durch eine wechselwirkende Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym initiiert. BMPs induzieren aus dem Epithel heraus die vermehrte Expression von Msx-1 und -2. TGF- $\beta$  unterstützt die Knorpelkondensation über die Produktion von Fibronectin aus dem Mesenchym heraus. Die Hochregulierung von Fibronectin und Activin stimulieren die Akkumulation von N-CAM und fördern so die Kondensation der mesenchymalen Zellen. Syndecan inhibiert wiederum die Fibronectinproduktion und damit die Zellkondensation woraufhin die Zellen anfangen können zu Chondroblasten und Chondrozyten zu differenzieren. (Quelle: Hall et al., 1995).

---

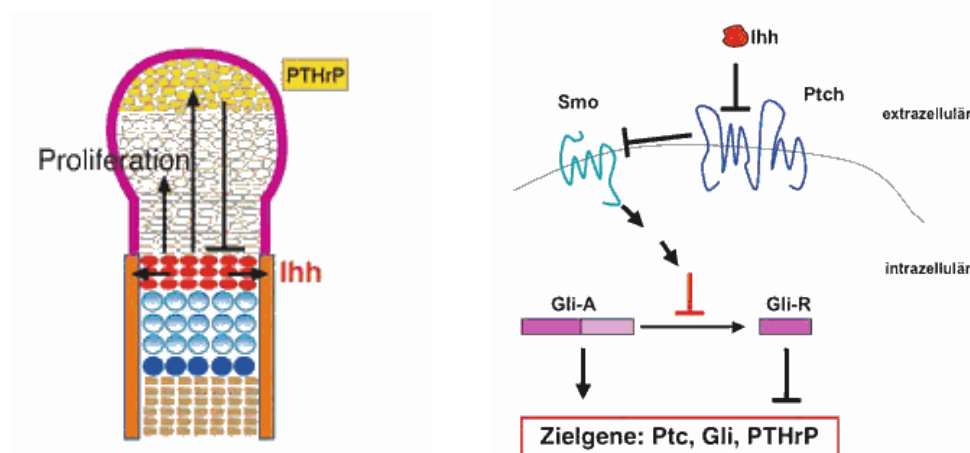
Die Untersuchung der Kampomelischen Dysplasie führte 1994 zur Identifizierung eines weiteren essentiellen Gens in der Regulation der frühen Chondrogenese (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994). Die Kampomelische Dysplasie zeichnet sich in ihrem Krankheitsbild durch schwere Skelettfehlbildungen aus und wird durch eine heterozygote Mutation des Sox9-Gens verursacht. Sox9 wird bereits in den kondensierenden mesenchymalen Zellen und allen weiteren Chondrozytenstadien mit Ausnahme der hypertrophen Chondrozyten exprimiert und induziert dort die Expression von Sox5 und Sox6. Diese drei Transkriptionsfaktoren werden in der frühen Chondrogenese vor allem für die Expression chondrozytenspezifischer Matrixproteine wie Col2a1, Col XI und Aggrecan benötigt (Lefebvre et al., 1997). Darüber hinaus ist Sox9 auch an der Koordination der prächondrogenen Zellkondensation, der Chondrozytenproliferation und der Chondrozytendifferenzierung beteiligt (de Crombrughe et al., 2000; Zhao et al., 1997).

Nach der chondrogenen Kondensation differenzieren die mesenchymalen Vorläuferzellen zu Chondroblasten und beginnen in ihrem Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum eine für den Knorpel charakteristische extrazelluläre Matrix (ECM) aus dem Kollagen Typ II und dem Proteoglykan Aggrecan zu sekretieren (Mundlos, 1994; de Crombrughe et al., 2000). Aus den Kollagenfasern bildet sich ein Netzwerk, das ein stark hydriertes Gel aus Proteoglykanen und Glykoproteinen umschließt. Die Chondrozyten lagern sich nach und nach säulenartig entlang der Längsachse der Knorpelanlage zusammen und verlängern das Primordialskelett durch ihre starke Proliferation und die Matrixsekretion (Naski et al., 1998; Minina et al., 2001). Durch die Sekretion der ECM rücken die Zellen immer weiter auseinander und sind nach einiger Zeit vollständig von der Interzellulärmatrix umschlossen. Zur gleichen Zeit bildet sich um die Knorpelanlage herum das Perichondrium, ein Bereich dicht gepackter mesenchymaler Zellen, die nicht zu Chondrozyten differenzieren und die Produktion des Kollagen Typ I beibehalten (Pechak et al., 1986a; Pechak et al., 1986b). Aus dieser Struktur können während der Chondrogenese zusätzlich mesenchymale Zellen in die Knorpelanlage rekrutiert werden, die dort zum Längen- und Dickenwachstum beitragen.

Sobald die Chondroblasten durch ihre Sekretion der Matrixproteine vollständig mit der ECM umschlossen sind, werden sie zu Chondrozyten, die in glattwandigen Höhlen der Knorpelmatrix liegen. Die eingeschlossenen Chondrozyten können sich noch teilen, so dass isogene Knorpelzellgruppen entstehen, die auch weiterhin Matrixproteine und Kollagene sekretieren (von der Mark et al., 1979; Pizette et al., 2001). Erreicht die Masse an



Chondrozyten eine charakteristische Größe, die für jeden Knochen unterschiedlich ist, hören die Zellen im Zentrum der Knorpelanlage auf zu proliferieren und werden zu prähypertrophen Chondrozyten, die immer noch die Kollagen Typ II-reiche ECM produzieren. Der prähypertrophe Chondrozyt ist hierbei vor allem durch die Expression von Ihh (Indian Hedgehog) (St-Jacques et al., 1999) charakterisiert und stellt den Übergang zum Hypertrophiestadium dar. Dieses Stadium zeichnet sich besonders durch die Expression von Kollagen X (Col10a1) und der Alkalischen Phosphatase (ALP) aus. Bei der Differenzierung von prähypertrophen zu hypertrophen Chondrozyten reguliert die Expression von Ihh (Indian hedgehog) direkt bzw. indirekt sowohl die Chondrozytendifferenzierung als auch die Proliferation der Chondrozyten (Vortkamp et al., 1996). Ihh ist ein sezerniertes Molekül, das erst nach Abschluss der mesenchymalen Kondensation in den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird und auch während der weiteren Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten und der Ausbildung des primären Ossifikationszentrums auf ausschließlich diesen Zelltyp beschränkt bleibt (Ferguson et al., 1998; Vortkamp et al., 1998, Cancedda et al., 2000). Der Regulationsmechanismus, über den Ihh die Chondrozytenproliferation induziert, wird durch die beiden Transmembranmoleküle Ptch und Smo vermittelt. In Abwesenheit von Ihh wird Smo (Smoothened) von Ptch (Patched) inhibiert (siehe Abbildung 8, rechts).



**Abbildung 8: Das Ihh/PTHrP-Signal-System**

Ihh (rot), welches in den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, induziert die Expression von PTHrP (gelb) in der periartikulären Region. PTHrP inhibiert das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung (links). Ihh induziert außerdem die Chondrozytenproliferation und den Ossifikationsprozess (orange) durch PTHrP-unabhängige Mechanismen.

Ihh reguliert die Chondrozytenproliferation über die beiden Transmembranmoleküle Ptch und Smo (rechts). In Abwesenheit von Ihh wird Smo von Ptch inhibiert. Durch die Bindung von Ihh an Ptch wird diese Inhibition aufgehoben und das Signal über eine mehrstufige Signalkaskade in die Zelle weitergeleitet, wodurch die Chondrozytenproliferation induziert wird.

(Quelle: Ganten et al., 2006)

---

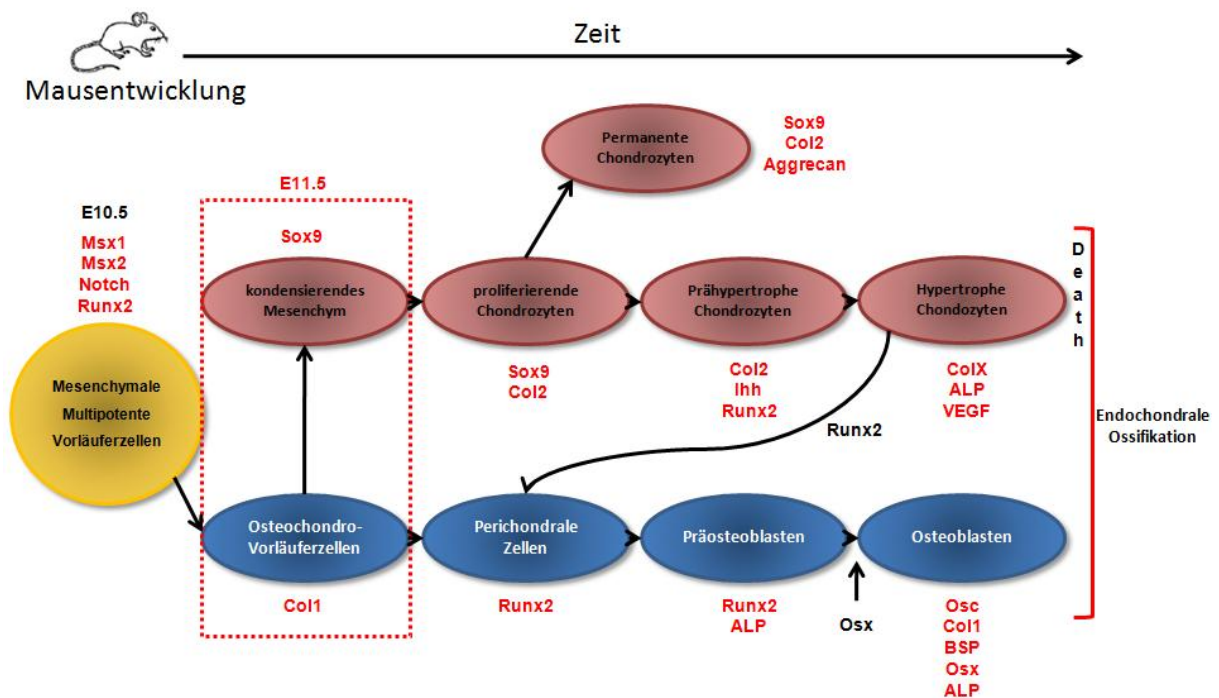
Durch die Bindung von Ihh an Ptch wird diese Inhibition aufgehoben und das Signal über eine mehrstufige Signalkaskade in die Zelle weitergeleitet, wo es die Chondrozytenproliferation induziert (Long et al., 2001; Minina et al., 2001). Ihh ist in der Lage, sowohl über kurze als auch lange Distanzen zu agieren, wobei die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix von besonderer Bedeutung zu sein scheint. So besitzt das Ihh, auf eine längere Distanz sekretiert eine indirekte Funktion in der Differenzierung von prähypertrophen Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten.

Im Rahmen der Ihh/PTHrP-Rückkopplungsschleife induziert Ihh die Expression von Parathyroid Hormone related peptide (PTHrP) (Shum et al., 2002; Kronenberg, 2003). PTHrP ist ein sezerniertes Molekül, welches normalerweise von den Zellen der periartikulären Zone und des Perichondriums exprimiert wird (Vortkamp et al., 1996) und eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Chondrozytenhypertrophie besitzt, indem es die Zellen, die den PTH/PTHrP-Rezeptor (PPR) exprimieren, in einem nicht-hypertrophen, proliferativen Status belässt (siehe Abbildung 8) (Suda, 1997). Dem PTHrP kommt daher eine wichtige Regulationsfunktion für die Organisation der Wachstumsfuge zu (Weisser et al., 2002). Darüber hinaus scheint PTHrP auch die Matrixkalzifizierung und ALP-Aktivität blockieren zu können, was durch eine Runx2-Inhibition bzw. durch eine Co-Inhibition durch weitere von PTHrP induzierte Transkriptionsfaktoren gezeigt wurde (Iwamoto et al., 2003).

PTHrP wird in der Epiphyse von den perichondrialen Zellen exprimiert und bildet durch Diffusion einen Gradienten in Richtung der Methaphyse aus (Kronenberg, 2003). Ihh dagegen wird von prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und diffundiert zu den Knorpelenden und in das Perichondrium und bildet somit ebenfalls einen Konzentrationsgradienten aus. Ihh und PTHrP bilden zusammen einen Rückkopplungsmechanismus, wobei Ihh die Synthese von PTHrP hochreguliert und hierbei über einen indirekten Mechanismus den Prozess der Chondrozytenhypertrophie verlangsamt (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996; Weir et al., 1996). Reicht die PTHrP-Konzentration aufgrund der zunehmenden Distanz zu der periartikulären Region nicht mehr aus, differenzieren die prähypertrophen Zellen zu hypertrophen Chondrozyten und beginnen Ihh zu exprimieren (siehe Abbildung 8).

Ein weiterer essentieller Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung beteiligt ist, ist Runx2 (siehe Abbildung 9) (Kim et al., 1999; Enomoto et al., 2000). Runx2, in früheren Studien auch Cbfa1 genannt, wird im angrenzenden Perichondrium und in den prähypertrophen Chondrozyten zeitgleich zu Ihh exprimiert (Inada

et al., 1999; Komori et al., 1997) und ist essentiell für die Osteoblasten-spezifische Genexpression (Ducy et al., 1997) und die Knochenbildung (Otto et al., 1997). Studien an Runx2-defizienten Mäusen zeigen, dass diese einen Phänotyp entwickeln, in welchem die späten Stadien der chondrogenen Hypertrophie blockiert sind und somit die Chondrozytenreifung gestört ist (Stricker et al., 2002; Kim et al., 1999). Durch die Blockade der terminalen Hypertrophie wird die ECM der Zellen nicht mehr mineralisiert und die Expression von Osteopontin und MMP-13 ist stark reduziert.



**Abbildung 9: Übersicht über die Differenzierungsprozesse der mesenchymalen Zellen**

Die mesenchymalen multipotenten Vorläuferzellen haben die Fähigkeit sich in unterschiedliche Zelllinien einschließlich der Chondrozyten (lila) und der Osteoblasten (blau), aber auch zu Myoblasten und Endothelzellen (nicht gezeigt) zu differenzieren. In der Abbildung ist der Ablauf der Differenzierungsprozesse mit den entsprechenden Markern zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten dargestellt. Die gestrichelte Box zeigt den Zeitpunkt der chondrogenen Kondensation, welche von der Notch Expression begleitet und durch die Msx-1,2 initiiert wird (welche während der Kondensationsphase durchgehend exprimiert bleibt) (verändert nach Knothe Tate et al., 2008).

Die Entwicklung des Skelettsystems wird im Gesamten über ein komplexes Regulationssystem unterschiedlicher Gewebe gesteuert. So beeinflusst die fortschreitende Differenzierung des Knorpels direkt oder indirekt die Reifung des angrenzenden Perichondriums. Sobald sich die anfänglichen Abgrenzungen zwischen dem Knorpel und dem Perichondrium entwickeln, differenzieren die Zellen in diesen beiden Bereichen jeweils zu Chondrozyten und Osteoblasten. Ob die Initiation der Chondrogenese hierbei die Osteogenese

---

einleitet, oder beide Prozesse simultan ablaufen, ist bisher noch nicht geklärt. Die darauffolgenden Schritte der Differenzierung sind zwischen diesen beiden Geweben klar aufeinander abgestimmt. So ist die Hypertrophie der Chondrozyten zum Beispiel sehr eng mit dem Umbau des Perichondriums zum Periosteum verbunden (Chung et al., 2001; Colnot et al., 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass viele unterschiedliche Faktoren, die von den Chondrozyten produziert werden und in die Proliferation, Reifung und Hypertrophie der Chondrozyten involviert sind, auch die Umgestaltung der Perichondriums zum Periosteum regulieren (Karsenty et al., 2002). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass Signale vom Perichondrium an der Regulation der Differenzierungsrate der Chondrozyten beteiligt sind (Kronenberg, 2003). So konnte in einer Studie bewiesen werden, dass die Entfernung des Perichondriums sowohl einen Einfluss auf die Proliferation als auch auf die Hypertrophie der Chondrozyten hat (Long et al., 1998; Colnot et al., 2004).

Während der Hypertrophie der Chondrozyten nimmt das Zellvolumen um das 7- bis 10-fache zu, die Teilungsfähigkeit ab und die Chondrozyten verlassen schließlich den Zellzyklus. Diese postmitotischen hypertrophen Zellen beginnen nun Kollagen Typ X und alkalische Phosphatase zu produzieren (Castagnola et al., 1988), während die Expression von Kollagen Typ II, die ausschließlich von der prähypertrophen Subpopulation von Chondrozyten synthetisiert werden kann, herunter reguliert wird (Linsenmayer et al., 1991) (siehe Abbildung 9). Die einsetzenden Expressionsmechanismen und die Sekretion von Kollagen Typ X stellen die notwendigen Bedingungen her, um die Mineralisierung der Chondrozyten ECM zu ermöglichen und den unteren Teil der hypertrophen Zone zu kalzifizieren. Die Matrix, welche die späten hypertrophischen Chondrozyten umschließt, wird durch die Ablagerung von Hydroxylapatitkristallen (beinhalten Calcium und Phosphat), die aus membranumhüllten Matrixvesikeln freigesetzt werden, mineralisiert (Anderson, 2003). Die extravasikulär wachsenden Hydroxylapatitkristalle lagern sich an den Kollagen-Mikrofibrillen an. Diese bestimmen die weitere Wachstumsrichtung der Apatitkristalle und werden schließlich vollständig von Apatit umgeben. Das terminale Differenzierungsstadium der Chondrozyten ist durch einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels gekennzeichnet, das notwendig für die Sekretion von Matrixvesikeln ist (Anderson, 2003). Die Phospholipidmembran der membrangebundenen Matrixpartikel, die von der Oberfläche der hypertrophischen Chondrozyten freigesetzt werden, enthält eine spezifische Kombination von Enzymen, einschließlich dem Annexin V und einigen Phosphatasen, die zur Regulation der Calciumphosphatbildung beitragen (Anderson, 1969; Kirsch, 2006; Kirsch et al., 1997). Die

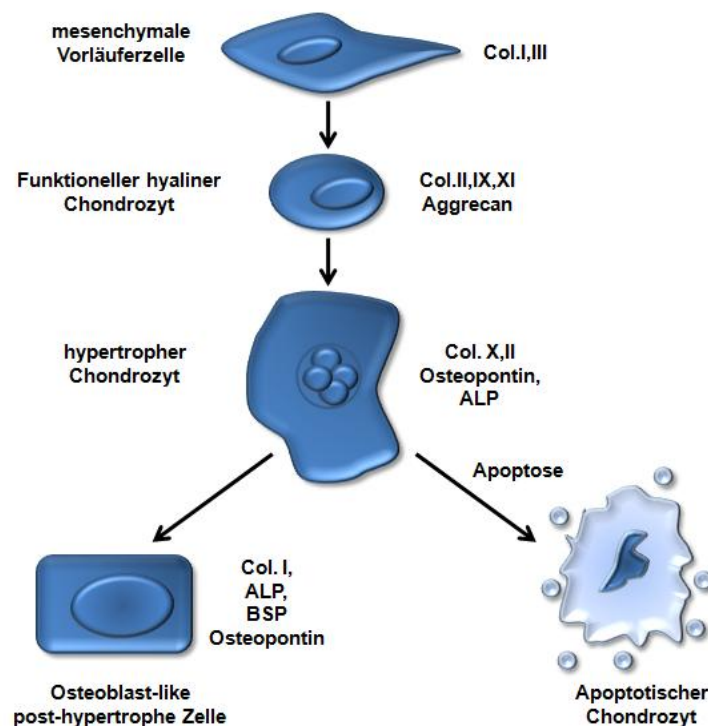
---

alkalische Phosphatase ist an die Oberfläche der Membran gebunden und für die Ablagerung von Calciumphosphat verantwortlich (Hsu, 1993). Dass die Mineralisierung der Matrixvesikel und der Knorpelmatrix im Besonderen von der Alkalischen Phosphatase Aktivität abhängig ist, konnte durch die TNAP (tissue-nonspecific alkaline phosphatase) knockout Maus demonstriert werden (Fedde et al., 1999; Anderson et al., 2004). In Mäusen, denen das Gen für die nicht-spezifische Alkalische Phosphatase fehlt, gelingt es den Chondrozyten in der frühen Knorpelanlage nicht zu terminalen Chondrozyten zu differenzieren und die Knorpelmatrix zu mineralisieren (Narisawa et al., 1997).

Der letzte Schritt der endochondralen Ossifikation ist der Ersatz des hypertrophen Primordialskeletts durch Knochen (Erlebacher et al., 1995). Am Ende der Differenzierung produzieren die terminalen hypertrophen Chondrozyten unter anderem den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Ferrara, 2000; Gerber et al., 1999), ein Signalmolekül, das die vaskuläre Invasion initiiert, sobald er aktiviert wird und damit die Angiogenese aus dem Perichondrium induziert und kontrolliert (Risau, 1997; Gerber et al., 2000). Zusätzlich sekretieren die Chondrozyten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die für die Degradation der Knorpelmatrix verantwortlich sind. Studien haben gezeigt, dass MMP-13, eine der am häufigsten von den terminalen Chondrozyten sekretierte Proteinase, für sich alleine nur eine geringe proteolytische Aktivität aufweist. Die Anwesenheit von MMP-9 scheint MMP-13 jedoch zu aktivieren und die proteolytische Aktivität stark zu erhöhen. MMP-9 seinerseits wird wiederum von den einwandernden Osteoklasten produziert. Durch diese Interaktion findet der proteolytische Abbau der Knorpelmatrix ausschließlich in den Regionen statt, in denen sich sowohl terminale hypertrophe Chondrozyten als auch eingewanderte Osteoklasten befinden.

Das Zusammenspiel von MMPs und VEGF ist zusammen mit einer großen Anzahl weiterer Faktoren für den Abbau von Knorpel versus Neubau von Knochen verantwortlich. Durch die einsprossenden Blutgefäße gelangen monozytäre Blutzellen in die Knorpelanlage und differenzieren nach Verlassen der Gefäße zu Makrophagen und Chondroklasten und bauen anschließend die noch nicht mineralisierten longitudinalen Septen ab. Gleichzeitig werden zwei Drittel der schon mineralisierten Septen durch die von Chondroklasten sekretierten MMPs abgebaut. Die eigentliche Knochenbildung beginnt mit der Besiedelung der Osteoblasten an den Resten der verkalkten longitudinalen Septen, wobei die Osteoblasten sich aus dem perivaskulären mesenchymalen Gewebe differenzieren. Durch die Osteoklasten wird

die Knorpelmatrix fortwährend zersetzt. Auf diese Weise wird ein Hohlraum, die spätere Knochenmarkshöhle, geschaffen (Vu et al., 1998). Parallel dazu zersetzen die hypertrophen Chondrozyten ihre extrazelluläre Matrix durch weitere MMPs und schaffen so Raum für die Invasion von weiteren Osteoblasten, die über die Blutgefäße einwandern und den Knochen aufbauen. Das Einwandern von Blutgefäßen und der anschließende Abbau des kalzifizierten Knorpels durch Chondroklasten werden durch die vorhergehende Mineralisierung der Interzellulärmatrix positiv beeinflusst (Gerber et al., 1999). Die Osteoblasten beginnen in den longitudinalen Septen eine sogenannte Knochen-ECM zu sekretieren, die reich an Kollagen Typ I und Osteocalcin ist (siehe Abbildung 9). Die Zellen im direkt an die hypertrophe Zone angrenzenden Perichondrium, differenzieren zu Osteoblasten und formen den Knochenschaft, der später zum kortikalen Knochen wird. Die terminalen hypertrophen Chondrozyten werden schließlich apoptotisch und sterben (Gerber et al., 1999; Gerber et al., 2000).



**Abbildung 10: Theoretisches Modell für den asymmetrischen Differenzierungsweg von Chondrozyten**

Der funktionelle hyaline Chondrozyt (z.B. Gelenkknorpelzelle) entsteht aus mesenchymalen Vorläuferzellen (z.B. im Perichondrium oder Periost). Eine Differenzierung zu hypertrophen Zellen ist erkennbar an der Expression von Kollagen Typ X und Alkalischer Phosphatase. In der fötalen Wachstumszone verharren hypertrophe Chondrozyten für einige Zeit als Knochenprotein-bildende Zellen (Osteoblast-like post-hypertrophe Zellen) in den Knochenbälkchen der Knorpel-Knochen-Umbauzone oder enden durch Apoptose. Quelle: Roach et al., 1995.

---

In einigen Studien wird jedoch auch ein anderes Schicksal für die terminalen Chondrozyten diskutiert. Galotto et al. (Galotto et al., 1994) postulieren aufgrund der Tatsache, dass terminale hypertrophe Chondrozyten eine Reihe charakteristischer Genprodukte von Osteoblasten, wie z.B. Osteopontin und Osteocalcin, exprimieren, zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen transdifferenzieren können (Oshima et al., 1989). Neuere Studien hingegen favorisieren die These, dass Chondrozyten durch Apoptose sterben, was durch morphologische und molekularbiologische Analysen gestützt wird (Cheung et al., 2003; Wang et al., 2003; Hatori et al., 1995).

Die gegenläufigen Resultate dieser unterschiedlichen Studien stehen jedoch nicht zwangsläufig in einem Widerspruch. So verband Roach et al. die beiden Theorien mit der Annahme, dass im letzten Schritt der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten eine asymmetrische Zellteilung stattfindet, wobei eine Tochterzelle durch Apoptose eliminiert wird, während die andere zu einer osteogenen Zelle differenziert (Roach et al., 1995) (siehe Abbildung 10).

---

### **1.2.2 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in hyalinem Knorpel**

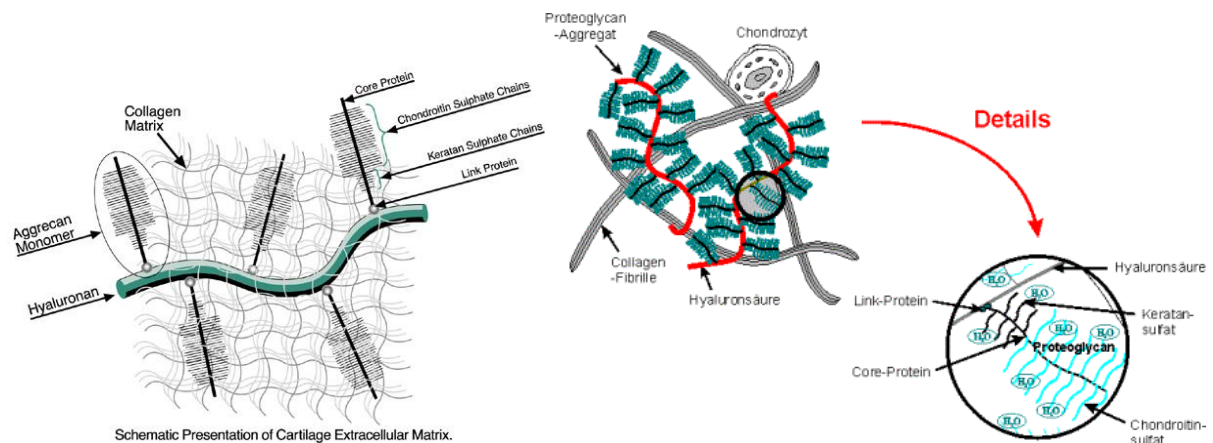
---

Strukturell besteht die gesunde Knorpelmatrix des hyalinen Knorpels aus den charakteristisch gebänderten kollagenen Fibrillen, die durch ihre Quervernetzungen die homogene Matrix aus nicht-fibrillärer Grundsubstanz, den Glykosaminoglykanen und den Proteoglykanen, in Form halten (siehe Abbildung 11).

Die Fibrillen bestehen zum größten Teil aus Kollagenen und sorgen so für die mechanische Festigkeit des Gewebes. Kollagene bilden die Hauptproteine der extrazellulären Matrix und repräsentieren mit 25-30% des Gesamtkörperproteins das größte Proteinkollektiv im Organismus (Alberts et al., 1997). Sie bestehen aus drei Polypeptidketten, die eine Tripelhelix bilden und einen hohen Anteil an Glyzin, Prolin und Hydroxyprolin enthalten. Diese tripelhelikale Struktur des Kollagens führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen. Von den bekanntesten 5 Kollagenen (I, II, III, V, XI), der insgesamt 19 entdeckten Kollagentypen (Alberts et al., 1997), besteht der hyaline Gelenkknorpel zu über 90% aus Kollagen II (Burgeson et al., 1992).

Die Hauptbestandteile der nicht-fibrillären Matrix sind hydratisierte Proteoglykane, die durch ihre Wassereinlagerung für den hohen Kompressionswiderstand des Knorpels sorgen (Poole

et al., 1984). Das Rückgrat jedes Proteoglykankomplexes ist ein langes Hyaluronsäuremolekül, das über Verbindungsproteine mit großen Glykosaminoglykanmolekülen (Keratansulfat, Chondroitinsulfat) vernetzt ist (siehe Abbildung 11, rechts).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der extrazellulären Knorpelmatrix**

Dargestellt ist die Quervernetzung von Kollagenfibrillen, welche die homogene Matrix aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen in Form halten. Quelle: links: <http://www.peprotech.com/uploadedimages/chart-2%281%29.jpg>; rechts: <http://www.uni-leipzig.de/~biophys/research/dossier/nmr/images/image004.gif>

Von allen Proteoglykanmolekülen scheinen die Aggrecane die größte Rolle für die elastischen und kompressiblen Eigenschaften des Knorpels zu spielen (Moreland, 2003; Yamanishi et al., 2002). Aggrecane machen etwa 10% des Knorpelgewichtes im hyalinen Knorpel aus und können an ihren negativ geladenen Sulfatgruppen Kationen und Wassermoleküle binden (Olsen et al., 2000; Kornak et al., 2003). Die Proteoglykane können bei Druck auf etwa 1/5 des von ihnen geforderten Raumes komprimiert werden und wirken so wie Sprungfedern, die zwar eine starke Kompression zulassen, aber sich danach sofort wieder ausdehnen und dabei das ausgepresste Wasser wieder anziehen. Diese biomechanischen Eigenschaften (Viskosität, Elastizität und Reißfestigkeit) definieren die Funktionseigenschaften des hyalinen Knorpels. Die Funktionstüchtigkeit des Knorpels hängt also zum einen von der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der Proteoglykane und ihren Glykosaminoglykanketten und zum anderen von dem geordneten Gefüge der Kollagenfibrillen ab. Beides kann mit zunehmendem Alter insuffizient werden und sich degenerativ verändern. Im Falle des Gelenkknorpels führt dies zu Arthrosen, da dieser kein Perichondrium für die Erneuerung der Knorpeloberfläche besitzt.



---

### **1.2.3 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im Knochen**

---

Grundsätzlich setzt sich die extrazelluläre Matrix des Knochens aus einer Mischung aus anorganischen Materialien wie Hydroxylapatit, Carbonaten, Fluoriden und anderen Salzen und aus organischen Materialien wie Kollagenen, Glykanen und Glykoproteinen zusammen (Sato et al., 1985). Die extrazelluläre Matrix wird im Knochen von den Osteoblasten bzw. den Osteozyten synthetisiert und im Verlauf des Knochenab- und -umbaus von den Osteoklasten wieder abgebaut (Raggatt et al., 2010). Durch die besondere Beschaffenheit des Knochens kann er eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen erfüllen. Die wohl wichtigste Rolle spielt der Knochen als hochdifferenziertes Stützgewebe, das für die Bewegung des Körpers und zum Schutz von Organen wie dem Gehirn essentiell ist. Zum anderen dient er dem Körper jedoch auch als wichtigster Speicher für Kalzium- und Phosphationen. Darüber hinaus fällt dem Knochen auch noch eine besondere Rolle als Stätte der Blutbildung zu, da er das Knochenmark beherbergt.

Zusammen mit 10% Wasser machen die anorganischen Bestandteile des Knochens etwa 80% aus. Die restlichen 20% entfallen auf organisches Material. Die organische Hauptkomponente wird vom Kollagen Typ I gebildet und verleiht dem Knochen die nötige mechanische Elastizität und Zugfestigkeit. Die anorganische Matrix besteht zum überwiegenden Teil aus Hydroxylapatitkristallen (Young, 2003), die sich als kleine, plattenförmige Kristalle in parallelen Schichten im Netzwerk des Kollagens ablagern (Weiner et al., 1992). Erst dieses Zusammenspiel zwischen organischen Proteinen und anorganischen Kristallen ermöglicht die Bruch- und Zugfestigkeit des Knochens. Fehlt eine Komponente, zum Beispiel die Mineralsalze, werden die Knochen biegsam wie Gummi. Demgegenüber werden die Knochen spröde und zerbrechlich wie Glas, wenn ihnen die Kollagene fehlen.

Neben den Kollagenen machen die nichtkollagenen Proteine nur etwa 10% der organischen Matrix aus. Sie spielen jedoch für die Knochenentwicklung und Homöostase des Knochens eine wichtige Rolle. Zu den nichtkollagenen Proteinen gehören zum Beispiel Proteoglykane, wie Decorin und Biglykan, und Zelladhäsionsmoleküle wie das Fibronectin. Weiterhin enthält der Knochen eine Reihe von matrixzellulären Proteinen wie Tenascin, Osteopontin und bone sialoprotein (BSP). Diese Proteine unterstützen u.a. die Differenzierung und Funktion der Osteoblasten und Osteoklasten und damit die Knochenbildung. Fehlen diese Proteine im Knochen, so äußert sich das oft in einer erhöhten Brüchigkeit von Knochen und in einer verlangsamten Heilung von Knochenbrüchen.

---

#### **1.2.4 Veränderung der extrazellulären Matrix während der endochondralen Ossifikation**



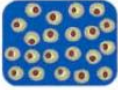
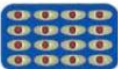

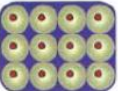

---

Der Prozess der endochondralen Ossifikation zeichnet sich im Besonderen durch die charakteristische Änderung der extrazellulären Matrix während der einzelnen Differenzierungsschritte der endochondralen Ossifikation aus. Die Bildung der frühen Knorpelanlage und die Differenzierung der mesenchymalen Zellen in Chondrozyten kennzeichnen den ersten Wechsel der Matrixzusammensetzung während der frühen Skelettentwicklung (siehe Abbildung 12).

Noch vor der Knorpelvorläuferkondensation produzieren die undifferenzierten mesenchymalen Zellen eine extrazelluläre Matrix (ECM), die reich an Kollagen Typ I ist (Dessau et al., 1980). Die ersten prä-chondrozytischen Zellen beginnen dann mit der Produktion eines knorpelspezifischen Kollagen Typ II (Sandell et al., 1994), Tenascin (Mackie et al., 1998) und Fibronectin (Kulyk et al., 1989; DeLise et al., 2000), während die Expression des Kollagen Typ I langsam herunter reguliert wird (DeLise et al., 2000). Anschließend produzieren die differenzierten frühen Chondroblasten zusätzlich Aggrecan (Mallein-Gerin et al., 1988; Tsonis et al., 1991) und ordnen sich säulenartig untereinander an. Dabei bildet sich ein Netzwerk aus Kollagenfasern, die ein stark hydriertes Gel aus Proteoglykanen und Glykoproteinen umschließen.

Im Laufe der weiteren Differenzierungsprozesse beginnen die prä-hypertrophen Chondrozyten mit der Produktion von Kollagen Typ X, während die Expression von Typ II Kollagenen herunter reguliert wird (Linsenmayer et al., 1991). Der hypertrophe Chondrozyt ist anschließend besonders durch seine ausschließlich aus Kollagen Typ X bestehende Matrix gekennzeichnet.

Durch die einsetzende Ossifikation während der terminalen Hypertrophie verändert sich die Zusammensetzung der Matrix noch einmal grundlegend (siehe Abbildung 12). Während dieses Prozesses wird von den hypertrophen Chondrozyten zusätzlich Matrix Metalloproteinase-13 und Alkalische Phosphatase sezerniert (Gerstenfeld et al., 1996). Diese sind hauptsächlich für den Abbau der Knorpelmatrix verantwortlich und sorgen für die Mineralisierung der kollagenen Knorpel-ECM. Desweiteren werden Hydroxylapatitkristalle und sogenannte nicht-Kollagenproteine in der Knochenmatrix produziert. Osteocalcin und Osteopontin (Hauschka et al., 1989), die vor allem an der Erhaltung der Knochensubstanz beteiligt sind, werden erst nach dem Einsetzen der Mineralisierung exprimiert.

Zelltyp	Erscheinungsbild	ECM Marker	Regulatorische Marker
Mesenchymale Zelle		Kollagen Typ I	SOX9, CBFA1
Prä-chondrozyt		N-CAM, Tenascin C (Kollagen Typ II)	SOX9 (SOX5, SOX6)
Früher Chondroblast		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein (COMP, Matrilin 1)	SOX5, SOX6, SOX9 (FGFR3, ATL2)
Säulenförmiger Chondroblast		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein, COMP, Matrilin 1	SOX5, SOX6, SOX9 FGFR3, ATL2
Prähypertropher Chondrozyt		Kollagen Typ II, Aggrecan, Link Protein, COMP, Matrilin 1 (Kollagen Typ X)	PTHr1, IHH, CBFA1, RUNX3
Hypertropher Chondrozyt		Kollagen Typ X	CBFA1, RUNX3, VEGF, (c-MAF)
Terminaler Chondrozyt		Matrix-metalloproteinase 13, Osteopontin	CBFA1, c-MAF

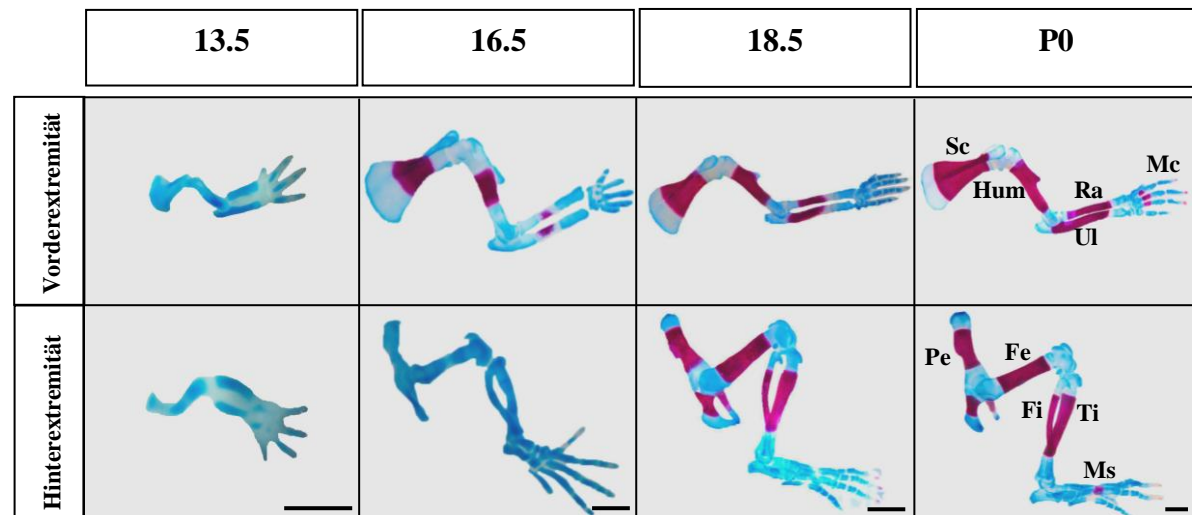
**Abbildung 12: Darstellung der ECM-Veränderung während der einzelnen Schritte der Chondrogenese**

Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Matrixveränderung und die dazugehörigen regulatorischen Marker, wie sie während der Knorpelentwicklung im Rahmen der endochondralen Ossifikation beobachtet werden können. (nach Lefebvre et al., 2005)

Durch die direkte Korrelation der Veränderung der Matrixzusammensetzung mit den einzelnen Differenzierungsschritten, lassen sich die Matrixproteine als charakteristische Differenzierungsmarker der endochondralen Ossifikation einsetzen (siehe Abbildung 12).

### 1.3 Die endochondrale Ossifikation während der embryonalen Skelettentwicklung der Maus

In der Maus kann man bereits am Embryonaltag 12.5 (E 12.5) die knorpeligen Anlagen der meisten Skelettelemente, die auf dem Wege der endochondralen Ossifikation kondensieren, nachweisen (nicht gezeigt). Am Embryonaltag 13.5 sind in den Mausembryonen die Knorpelanlagen, die als Grundlage der späteren Scapula (Sc), des Humerus (Hum), Radius (Ra), Ulna (Ul) und allen Knochen des Metacarpus (Mc) dienen, deutlich zu erkennen.



**Abbildung 13: Übersicht über die embryonale Knorpel- und Knochenentstehung in der Wildtypmaus**

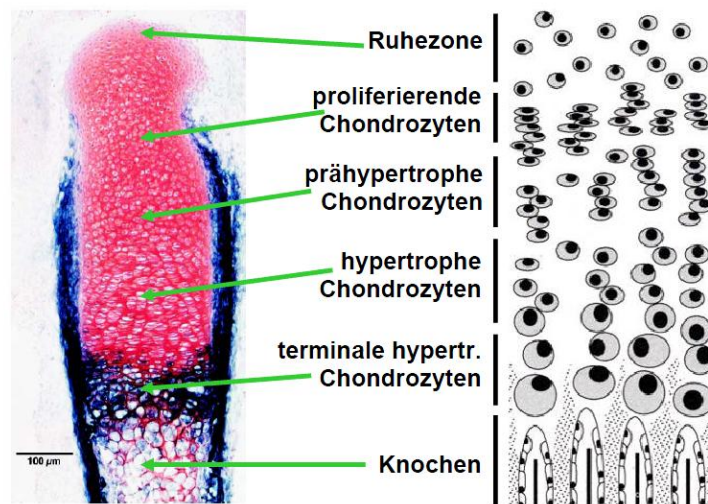
Dargestellt ist der zeitliche und räumliche Verlauf der Knorpel- und Knochenentwicklung der vorderen und hinteren Skelettelemente der Wildtypmaus. Hierfür wurde unterschiedliche Entwicklungsstadien präpariert und mit Alcianblau (Knorpel) und Alizarinrot (Knochen) gefärbt. Im Stadium E13.5 sind die kondensierten Knorpelanlagen der Skelettelemente gut sichtbar. Zu E16.5 sieht man die beginnende Mineralisierung der Knochenelemente der Vorderextremität während die Hinterextremität ausschließlich Knorpelmatrix aufweist. Mit dem Entwicklungstag E18.5 ist die Ossifikation bereits in beiden Extremitäten weit fortgeschritten aber erst zu P0 werden auch die Ossifikationszentren in den Fingerknochen sichtbar. (Pelvis (Pe), Femur (Fe), Tibia (Ti), Fibula (Fi), Metatarsala (Ms)); Maßstab: 0,5 mm (Quelle: eigene Aufnahmen).

Ab E14.5 sind die verschiedenen Entwicklungsstufen der Chondrozyten erkennbar. Die Zone der proliferierenden Chondrozyten hat sich nach außen hin verschoben und im Zentrum der Knochenanlagen sind nun die hypertrophen Chondrozyten lichtmikroskopisch deutlich sichtbar. In diesem Entwicklungsstadium zeigen sich auch die ersten Anzeichen für die Knochenbildung im Humerus (Wenzel, 2003).

Ab dem Entwicklungstag E16.5 zeigt ein Großteil der vorderen Extremität bereits eine deutliche Mineralisierung der Knochenmatrix, während in der hinteren Extremität erst der Abbau der Knorpelmatrix im primären Ossifikationszentrum (an der helleren Blaufärbung erkennbar) eingeleitet wird.

Zu E18.5 sind beide Extremitäten deutlich im primären Ossifikationszentrum mineralisiert, die Ossifikation der Fingerknochen ist jedoch erst zu P0 abgeschlossen (siehe Abbildung 13).

Mit Hilfe von Gefrierschnitten und unterschiedlichen histologischen Färbungen können die Differenzierungsprozesse während der embryonalen Knorpel- und Knochenentwicklung detailliert studiert werden.



**Abbildung 14: Überblick über die Lokalisation der Chondrozyten im histologischen Schnitt**

Dargestellt ist eine Alkalische Phosphatase/Safranin O Färbung und schematische Darstellung der Differenzierungstypen der Chondrozyten. (Quelle: links: modifiziert nach Shum et al., 2002; rechts: modifiziert nach Horton, 1993).

In der in Abbildung 14 dargestellten Färbung sind deutlich die einzelnen Stadien der Chondrozytendifferenzierung an der Morphologie und Position der Zellen zu erkennen. Unter der sich anschließenden Wachstumsfuge (Bereich der terminalen hypertrophen Chondrozyten) schließt sich das bereits mineralisierte Knochengewebe an.

---

## Zielsetzung

---

Seit erstmals vor 40 Jahren an histochemischen Färbungen nachgewiesen werden konnte, dass die Cholinesterasen bereits während der frühen Skelettentwicklung in Knochenstrukturen aktiv sind, gibt es immer wieder *in vitro* Studien, die zeigen das unterschiedliche Komponenten des nicht-neuronalen cholinergen Systems eine Rolle in den Differenzierungsprozessen von Chondrozyten und Osteoblasten zu haben scheinen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch die Analyse des Aktivitätsmusters der Acetylcholinesterase und der Untersuchung einzelner differentiell exprimierter chondrogener Gene ein besseres Verständnis über die Beteiligung des nicht-neuronalen cholinergen Systems an den Regulationsprozessen der endochondralen Ossifikation zu erlangen.

Dazu wurde zunächst das Aktivitätsmuster der AChE während der frühen Extremitätenentwicklung im Huhn näher untersucht. Daran anschließend sollte der Einfluss der unterschiedlichen Aktivitätszentren der AChE auf die endochondrale Ossifikation durch Inhibitionsversuche *in vivo* näher untersucht werden. Hierfür wurden *in ovo* Hühnerembryonen der Stadien HH 17/18 Agarosebeads in die Extremitätenknospen implantiert, die zuvor in unterschiedlichen AChE-Inhibitoren getränkt wurden.

Anhand von Cholinesterase-Knockout Mäusen sollte das veränderte Expressionsprofil von typischen chondrogenen Markern wie Kollagen Typ II, Kollagen Typ X, Ihh, MMP-13 mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) näher studiert werden. Die daraus gewonnen Daten sollen Aufschluss darüber geben welche entscheidenden Regulationsprozesse der Chondrogenese durch das Fehlen von Cholinesterasen beeinflusst werden.

Abschließend sollte durch die Verwendung eines extra an die Fragestellung angepassten *high density* Micromasskultursystems geklärt werden, welche Komponenten des nicht-neuronalen cholinergen Systems für die veränderten Regulationsprozesse der Skelettogenese verantwortlich sind.

---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Material

---

#### 2.1.1 Chemikalien

---

Chemikalie	Bezugsquelle
Acetylthiocholin iodid (ATC)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Agarose	PeqLab, Erlangen
Alcianblau 8GS	Roth, Karlsruhe
Alizarinrot S	Merck, Darmstadt
Alkaline phosphatase	Roche, Mannheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
L-Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Auftragspuffer DNA (6x)	Roth, Karlsruhe
BCIP	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Bovine Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Butyrylthiocholin iodide	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
BW284c51	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrate	Merck, Darmstadt
100 bp DNA-Leiter, extended	Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Roche, Mannheim
5,5'-Dithio-bis-2-nitro-benzoacid (DTNB)	Sigma, Deisenhofen

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
dNTP-Mix (10 mM)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merk, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendinitrotetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Eukitt	O. Kinder, Freiburg
D-Glucose Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
iso-OMPA	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merk, Darmstadt
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Eppendorf, Hamburg
Methyllycaconitine citrate salt hydrate (MLA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt



di-Natriumtetraborat	Merck, Darmstadt
NBT	Merck, Darmstadt
Nicotin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol	VWR, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek <sup>®</sup> Neg50	Richard-Allan Sci, Kalamazoo, MI
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe

### 2.1.2 Enzyme

Dispase II	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Trypsin	Cell Systems, USA

### 2.1.3 Sonden für die in situ Hybridisierung

Sonde	Name	Organismus	Antibiotika	Enzym	Hersteller
m Col X	Kollagen Typ X	Maus	Ampicillin	XhoI, T3	S. Mundlos
r Col II	Kollagen Typ II	Ratte	Ampicillin	HindIII, T7	Y. Yamada
m Ihh	mIHH-900	Maus	Ampicillin	Xba, T7	A. McMahon
m MMP 13	Matrixmetalloprotein 13	Maus	Ampicillin	HindIII, T7	A. Vortkamp

---

## 2.1.4 Chemikalien für die Zellkultur

---

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Gentamycin	Gibco, Eggenstein
Ham' F12	c.c.pro, Oberdorla
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Hühnerserum (CS)	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco, Eggenstein
Trypsin	Cell Systems, USA
Trypsin/EDTA	Gibco, Eggenstein

---

## 2.1.5 Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die Zellkultur

---

Kulturmedium	DMEM, 10% FCS, 2% CS, 1% L-Glutamin, 20 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 20 µg/ml Gentamycin.
Differenzierungsmedium	DMEM, 10% FCS, 2% CS, 20 µg/mL Ascorbinsäure 3,7 mg/mL NaHCO <sub>3</sub> , 1 g/L Glucose, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1% L-Glutamin, 20 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 20 µg/ml Gentamycin.

---

### 2.1.6 Zusammensetzung von Färbelösungen

---

Alcianblau (pH 1,0)	100 mg Alcianblau, 900 mL 96% EtOH, 100 mL Salzsäure.
Alcianblau (pH 2,5)	100 mg Alcianblau, 800 mL EtOH, 200 mL Essigsäure.
Alizarinrot	0,4 mg/mL Alizarinrot S, gelöst in 0,5% KOH.
Alkalischer Phosphatase Puffer	100 mM Tris (pH 9.5), 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,1% Tween-20.
Blocklösung für Antikörperfärbungen	3% BSA, 0,1% Triton X-100, in 1x PBS.
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser.
Karnovsky-Roots-Lösung	5% 0,1 M Na-Citrat, 10% 30 mM CuSO <sub>4</sub> , 10% 5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 0,72 mg/ml ATC, 10 <sup>-4</sup> M iso-Ompa, in Tris-Maleat-Puffer.
Toluidinblau	0,1% Toluidinblau In 70% Isopropanol lösen.
Tris-Maleat-Puffer	0,1 mM Tris, 0,1 mM Maleinsäure, in H <sub>2</sub> O gelöst, pH auf 6.0 einstellen.

---

### 2.1.7 Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für in situ Hybridisierung

---

Alkaline Lysis Solution I	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), in dest. H <sub>2</sub> O.
---------------------------	--

Alkaline Lysis Solution II	0,2 N NaOH, 1 % SDS, in dest. H <sub>2</sub> O.
Alkaline Lysis Solution III	5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml dest. H <sub>2</sub> O.
20xSSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0.
DIG-Nucleotid Mix	20 µL 10 mM ATP, 20 µL 10 mM CTP, 20 µL 10 mM GTP, 13 µL 10 mM UTP, 7 µL 250 nM dig-UTP für den Einsatz 1:10 verdünnen.
Waschlösung	50% Formamid, 0,1% Tween 20, 20x SSC.
MABT-Puffer	100 mM Maleinsäure (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20.
Alkalischer Phosphatase Puffer	100 mM Tris (pH 9.5), 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,1% Tween-20.
Hybridisierungspuffer	25 mL Formamid, 12,5 mL 20xDEPC-SSC, 50 µL 50 µg/mL Heparin, 125 µL 200 µg/µL torula-RNA, 50 µL Tween-20, auf 50 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O auffüllen.

## 2.1.8 Geräte

Abzug 2-453-DAHD	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Analysenwaage 2004MP	Sartorius, Göttingen

Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
Binoculare Stemi 2000C SMZ 1500	Carl Zeiss, Jena Nikon, Japan
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell 240	Thermo Scientific, Langenselbold
Eierinkubator	Ehert, Emmendingen
Feinwaage Sortorius 2004MP MJ-500	Waagen-Kissling, Rimbach
Gelapparatur	Peqlab, Erlangen
Kryostat HM5000M	Microm, Walldorf
Laborwaage 1202MP	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer IKA-Combimag	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskope Axiovert S100 Axiophot light (Fluoreszenz) Olympus SC 35	Carl Zeiss, Jena Carl Zeiss, Jena Olympus, Hamburg
pH-Meter MP220	Mettler, Toledo
Schüttler Reax3 Innova 4080	Heidolph, Deutschland New Brunswick Scientific
Spektralphotometer UV/VIS Lambda 2	Perkin Elmer, Langen
Sterilbank Lamin Air® HERAsafe	Heraeus, Hanau Thermo Scientific, Langenselbold
Tischzentrifuge C-1200	Labnet, Woodbridge, NJ
Vortexer Reax3 Top-Mix 94323	Heidolph, Deutschland Heidolph, Deutschland
Wärmeschrank T6060	Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählkammer Neubauer	VWR Darmstadt

Zellkulturbank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sorvall®RC-5B mit SS-34 Rotor Biofuge Primor	Sigma, Heidelberg Thermo Electron Corporation, Osterode

### 2.1.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Affi-Gel Blue Gel Beads (Agarosebeads)	Biorad Laboratories, München
Deckgläser 9x18 mm	Merck, Darmstadt
Einbettform	Polyscience
Einmalkanülen 0,9x40 und 0,6x30 mm	Braun, Melsungen
Einmalspritzen (2,5, 5, und 10 mL)	Braun, Melsungen
Objektträger 25x75x1 mm Superfrost Plus	Thermo Scientific, Braunschweig
Objektträger 76 x 24 mm	Greiner, Frickenhausen
Parafilm	NeoLab, Heidelberg
Pasterupipetten	Alpha Laboratories Ltd, Eastleigh, UK
Petrischalen (35 – 150 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5 und 2 mL)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten (12- und 24 Lochplatten)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhren (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht

---

## 2.2 Methoden

---

### 2.2.1 Verwendete Tiermodelle

---

Die meisten der bisher gewonnenen Erkenntnisse über die molekularen und zellulären Grundlagen der Skelettentwicklung stammen aus den Ergebnissen von Tierstudien und Untersuchungen menschlicher Knochenerkrankungen. Die Wahl des Modellorganismus hängt hierbei vor allem von der biologischen Fragestellung ab. Für die Untersuchung der Rolle des nicht-neuronalen cholinergen Systems in der Skelettentwicklung werden in dieser Studie unterschiedliche Tiermodelle herangezogen. Die ersten Erkenntnisse werden anhand von *in vivo* und *in vitro* Experimenten am Modellsystem Huhn gewonnen. Weiterführende Untersuchungen zum besseren Verständnis der Zusammenhänge der Cholinesterasen während der frühen Knochenentwicklung werden an Cholinesterase-knockout Mäusen durchgeführt.

---

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Hühnerembryonen

---

Für die nähere Untersuchung der Cholinesterasefunktion während der frühen Skelettentwicklung wird zu Beginn der Studie das Huhn als Tiermodell herangezogen. Der Hühnerembryo stellt in der embryonalen Entwicklungsbiologie ein klassisches Tiermodell dar, da es während der gesamten Embryonalentwicklung leicht zugänglich und *in ovo* manipulierbar ist und somit die idealen Voraussetzungen für die Untersuchung der embryonalen Skelettentwicklung bietet. Ein weiterer Vorteil dieses Tiermodells liegt darin, dass es in hoher Zahl verfügbar ist und die Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Hühnerembryonen durch einen sehr geringen Arbeitsaufwand selbst durchgeführt werden kann. Die für die Experimente eingesetzten Bruteier der Hühnerrasse *White Leghorn* werden einmal wöchentlich von den LSL-Geflügelvermehrungsbetrieben Rhein-Main in Dieburg bezogen und bis zur weiteren Bebrütung bei 18°C in einem Lagerschrank zwischengelagert. Die Kultivierung der Bruteier erfolgt in einem Brutschrank auf speziell dafür vorgesehenen horizontalen Drehschienen, die eine automatische Rotation in vierstündigem Rhythmus bei 36,5°C und 60-65% Luftfeuchtigkeit ermöglichen. Die Bebrütungsdauer der Eier richtet sich nach dem zu verwendenden Embryonalstadium der Hühnerembryonen. Die morphologische Zuordnung der Embryonen in ihre Entwicklungsstadien erfolgt hierbei nach Hamburger und Hamilton (Hamburger und Hamilton, 1951). In der vorliegenden Arbeit werden für die unterschiedlichen *in vivo* Manipulationen Embryonen der Hamburger-Hamilton-Stadien (HH) 17 bis 22 verwendet. Die manipulierten Hühnerembryonen werden anschließend bis zum

---

Entwicklungsstadium HH 37/38 im Brutschrank weiterkultiviert, allerdings wird hier auf die Drehvorrichtung verzichtet und die Eier in einem dafür vorgesehenen Gestell stationär kultiviert.

---

#### **2.2.1.2 Präparation und Manipulation der Hühnerembryonen**

---

Um ein steriles Arbeiten zu gewährleisten, werden alle zur Manipulation zu verwendenden Instrumente und die verwendeten Eier im Vorfeld mit 70% Ethanol desinfiziert. Für die Manipulation werden die Eier aus dem Brutschrank genommen und in horizontaler Lage auf ein Eiergestell gelegt, um den Transport und die weitere Behandlung der Eier in unveränderter Lage des Embryos im Ei zu gewährleisten. Die Eier werden circa eine Stunde vor dem Öffnen auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Durchblutung des Embryos während des invasiven Eingriffs so gering wie möglich zu halten und einen zu hohen Blutverlust während der Manipulation zu vermeiden.

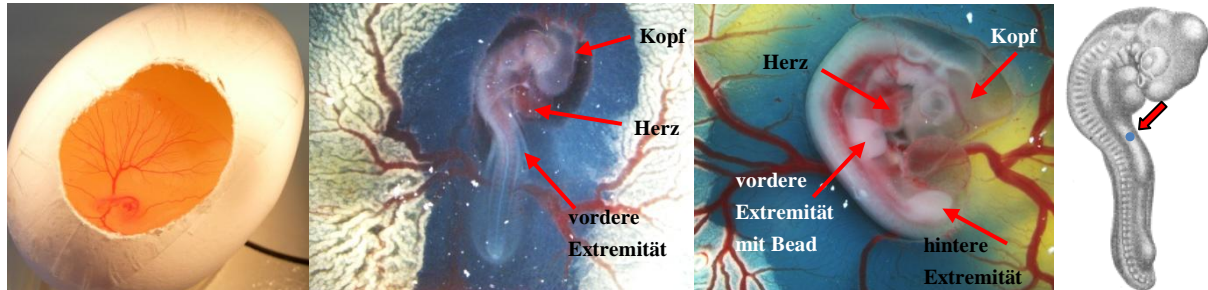
Vor Beginn der Manipulation werden die Eier an ihrer stumpfen Seite mit einer Präpariernadel eröffnet und etwa 4-5 mL Eiweiß pro Ei abgesaugt. Dadurch sinken Eidotter und Embryo im Ei ab und werden für die Präparation zugänglich. Die Einstichstelle wird anschließend sorgfältig mit einem Stück Tesafilm verschlossen. Danach wird mit der Präpariernadel ein weiteres Loch in die Oberseite des Eis gestochen. Damit während der Eröffnung keine Schalenstücke in das Innere des Eis gelangen wird die Oberfläche um die Einstichstelle herum sorgfältig mit Tesafilm abgeklebt. Mit einer feinen, gebogenen Schere wird die Schale um die Einstichstelle herum kreisförmig eröffnet. Durch das so entstandene Manipulationsfenster ist der Blick auf den zu manipulierenden Embryo nun frei (siehe Abbildung 15, links). Das Chorion und das Amnion des Embryos werden anschließend vorsichtig mit einer Manipulationsnadel und einer feinen Pinzette zur Seite gezogen und die vordere Extremität freigelegt (siehe Abbildung 15, Mitte).

Der so präparierte Embryo ist nun für die Manipulation bereit. Vor jeder Manipulation wird das Stadium des Embryos anhand der morphologischen Zuordnung nach Hamburger und Hamilton (Hamburger und Hamilton, 1951) bestimmt. In der vorliegenden Arbeit werden überwiegend Embryonen der Stadien HH 17/18 für die Manipulationen verwendet. Um den Einfluss der AChE auf die Skelettentwicklung untersuchen zu können, werden die Embryonen mit unterschiedlichen AChE-Inhibitoren behandelt. Hierfür werden Affi-Gel Blue



---

Gel Beads der Firma Biorad, auch kurz Agarosebeads genannt, für 2-3 h in den Stammlösungen des BW284c51-Inhibitors ( $10^{-2}$  M) und dem Mab 304 AChE-Antikörper inkubiert.



**Abbildung 15: Öffnung und Manipulation eines Hühnerembryos *in ovo***

Dargestellt ist die Eröffnung eines Eis. Im Manipulationsfenster (links) ist ein Hühnerembryo im Stadium HH 20 zu sehen. In den beiden mittleren Bildern sind präparierte Hühnerembryonen der Stadien HH 18 und HH 22 dargestellt. Zu HH 18 wird der mit BW-getränkte Bead, wie im rechten Schemabild gezeigt, in den anterioren Bereich der frühen Hühnerextremität implantiert.

Damit die Beads während dieser Inkubation nicht zu stark austrocknen, werden 70  $\mu$ L der Stammlösung mit ca. 100 Beads in einem 0,1 mL PCR Tube bei 4°C inkubiert. Die verwendeten Inhibitoren diffundieren während der Inkubationszeit in den Agarosebead bis dieser gesättigt ist. Vor der Implantation werden ca. 5  $\mu$ L der Beadsuspension in eine kleine Petrischale pipettiert. Um die Verdunstung so gering wie möglich zu halten, werden um die Beadsuspension herum noch weitere 5 Tropfen aus je 5  $\mu$ L PBS pipettiert. Die Extremität des zu manipulierenden Embryos wird von den umgebenden Membranen befreit und mit Hilfe einer Insektennadel der Stärke 0 ein kleines Loch in das anteriore Gewebe der Extremität gestochen. Der Inhibitor-getränkte Bead wird mit einer feinen Pinzette direkt über der Einstechstelle platziert. Anschließend wird mit Hilfe einer feinen Manipulationsnadel versucht den Bead durch das Loch in dem darunter liegendem Gewebe zu platzieren (siehe Abbildung 15). Die so manipulierten Hühnerembryonen werden anschließend noch weitere 8-9 Tage (bis HH 37/38) bei einer Temperatur von 36,5°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 60-65% ohne Rotation weiterkultiviert und anschließend in 4% PFA/PBS pH 7,3 fixiert.

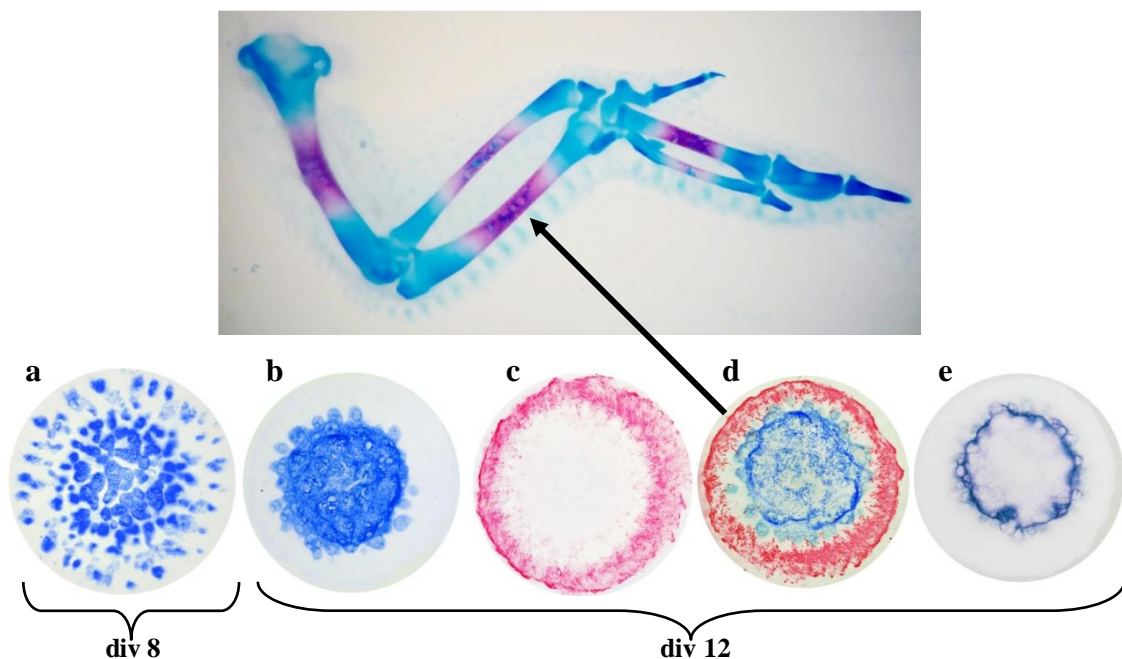
---

### 2.2.1.3 Herstellung der High density Mikromasskultur

---

Um die Rolle des nicht-neuronalen cholinergen Systems während der Prozesse der endochondralen Ossifikation genauer untersuchen zu können, werden zusätzlich zu den

*in vivo* Experimenten auch *in vitro* Studien durchgeführt. Hierzu wurde in dieser Studie auf die *High density* Mikromass-Kultivierung zurückgegriffen (siehe Abbildung 16). Diese Methode wurde erstmals 1973 von Drews beschrieben (Drews und Drews, 1973, Ahrens et al., 1977). Während der letzten Jahrzehnte sind die Manipulations- und Kultivierungsbedingungen dieser Methode weiter verbessert worden, so dass in dieser Arbeit ein leicht verändertes Protokoll aus der Arbeit von Lehmann (Lehmann et al., 2003) zum Einsatz kam.



**Abbildung 16: Differenzierungsprozesse in der Micromass-Kultur imitieren die endochond. Ossifikation**

Dargestellt sind die mesenchymalen Zellen der Vorderextremität des Huhns zu unterschiedlichen Kultivierungstagen *in vitro*. In (a) ist eine Alcianblau gefärbte Micromasskultur nach 8 Tagen in Kultur gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die mesenchymalen Vorläuferzellen kondensieren und beginnen die typische Knorpelmatrix zu produzieren. Während der späteren Kultur differenzieren die Zellen weiter zu Knochenmatrix-produzierende post-hypertrophe Zellen, die um den inneren Knorpelkern einen mineralisierten Knochenring bilden (b: Alcianblau = Knorpel; c: Alizarinrot = Knochen). In der Doppelfärbung zeigt sich eine morphologische Homologie zur endochondralen Ossifikation im Flügelknochen (d). *In vitro* ist die Übergangszone zwischen dem Knorpel und dem Knochen durch eine starke Aktivität der alkalischen Phosphatase gekennzeichnet. In der Micromass-Kultur kann die Alkalische Phosphatase ebenfalls in dem Zwischenbereich zwischen dem Knorpel und den Knochen nachgewiesen werden (e). Die in (b-e) gezeigten Micromass-Kulturen sind 12 Tage in Kultur gewesen.

Für die Herstellung der Micromass-Kultur werden von den Hühnerembryonen der Stadien HH 21-23 die vorderen Extremitätenknospen abgetrennt und aus ihnen die Primärkultur angesetzt.

Vor der Präparation werden die Eier und das Präparierbesteck mit 70% Ethanol gereinigt, um eine mögliche Kontamination der Primärkultur so gering wie möglich zu halten.

---

Anschließend wird das Ei am stumpfen Ende mit einer Präpariernadel eröffnet. Dadurch kann die Luft aus der Luftkammer entweichen und der Eidotter sinkt mit dem Embryo ein Stück nach unten, so dass dieser bei der Eröffnung der Eis nicht verletzt wird. Anschließend wird das Ei an der oberen Seite eröffnet und der Embryo mit Hilfe einer gebogenen Pinzette aus dem Ei gehoben und in eine mit eiskaltem F12 gefüllte Petrischale überführt. Für eine Präparation werden im Schnitt 36x Eier verwendet. Sobald alle Embryonen in einer Petrischale gesammelt wurden, werden diese kurz in F12 gewaschen und anschließend in eine neue Schale mit frischem eisgekühlten F12 überführt. Anschließend werden die einzelnen Embryonen für die Präparation der Extremitätenknospen in eiskaltes HBSS überführt und die Extremitätenknospen unter dem Binokular entfernt. Im nächsten Schritt muss das Ektoderm gründlich vom Mesenchym entfernt werden, da für die Primärkultur ausschließlich die mesenchymalen Zellen verwendet werden und Reste des Ektoderms die Differenzierungsprozesse in der Primärkultur stark verzögern bzw. inhibieren können. Für die Entfernung des Ektoderms werden die Extremitätenknospen in eine frische Petrischale (35 mm) überführt und in eine Lösung aus gleichen Teilen Dispase (3 mg/mL) und Trypsin (0,1 mg/mL) gegeben und für 20 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend kann das Ektoderm mit einer feinen Pinzette unter dem Binokular vom Mesenchym abgetrennt werden. Das mesenchymale Gewebe wird in einem 1,5 mL Eppi gesammelt. Für die Herstellung einer Primärkultur müssen die Zellen im nächsten Schritt vereinzelt werden. Hierzu wird 05% Trypsin/EDTA zu den mesenchymalen Geweben gegeben und dieses 5-10 min darin inkubiert (Inkubationszeit ist von der Menge des Gewebes abhängig). Danach werden die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren aus ihrem Zellverband gelöst und vereinzelt. Die vereinzelt Zellen werden in einer Tischzentrifuge 2 min abzentrifugiert und in 1 mL Kulturmedium (mit FCS) resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt und nach der Zellzählung auf einen Zelltitel von  $2 \times 10^{-7}$  Zellen pro mL eingestellt. Für die Aussaat der Primärkultur werden 10 µL Tropfen der Zellsuspension ( $2 \times 10^{-7}$  Zellen pro mL) pro Kavität einer 24-Lochplatte ausgesät und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die Tropfen mit 500 µL Kulturmedium überschichtet und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator inkubiert. Am folgenden Tag wird das Kulturmedium erneuert, um abgestorbene oder nicht angewachsene Zellen aus der Zellkultur zu entfernen.

---

#### 2.2.1.4 Kultivierung der Micromasskultur

---

Die weitere Handhabung der primären Micromasskulturen sowie alle weiteren Experimente erfolgen unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank. Die zu verwendenden Lösungen und Medien werden entweder durch Filtration oder durch Autoklavieren sterilisiert. Vor Gebrauch werden alle Lösungen in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt, damit die Zellen auch außerhalb des Inkubators möglichst optimale Temperaturbedingungen vorfinden. Die Verweildauer der Primärkulturen außerhalb des Inkubators wird während der Versuche aber auch während des Medienwechsels so kurz wie möglich gehalten. Alle Glaswaren und Pipetten werden, bevor sie unter die Zellkulturbank gelegt werden gründlich mit 70% Ethanol gereinigt. Zusätzlich wird die Zellkulturbank am Ende des Tages für eine Stunde mit UV-Licht sterilisiert.

Für die Kultivierung der Primärkultur werden zwei unterschiedliche Medien verwendet. Die ersten zwei Tage in Kultur werden die Zellen in einem Standard-Kulturmedium kultiviert. Dieses Medium besteht aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), dem 10% FCS, 2% CS, 1% L-Glutamin und verschiedene Antibiotika zugesetzt sind. Ab dem dritten Kultivierungstag wird das Kulturmedium durch ein spezielles Differenzierungsmedium ersetzt, dem, für die Untersuchung der einzelnen Komponenten des nicht-neuronalen Systems, unterschiedliche Konzentrationen des AChE Inhibitors BW284c51 (20 µM, 50 µM und 100 µM Endkonzentration in Kultur), Nicotin (5 µM, 10 µM und 20 µM) oder MLA (2,5 µM, 5 µM und 10 µM), einen spezifischen Inhibitors des nikotinischen AChRs, zugegeben werden. Das Differenzierungsmedium unterscheidet sich von dem Kulturmedium darin, dass ihm speziell für die Förderung der Mineralisierung zusätzlich Glucose, Natriumhydrogencarbonat, Calciumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat und Ascorbinsäure zugesetzt wurde. Während der weiteren Inkubation wird das verbrauchte Medium in den Kulturen täglich bzw. jeden zweiten Tag durch frisches Medium ersetzt. Die Kulturen werden anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturinkubator weiter kultiviert.

Um eine reproduzierbare Aussage über den Einfluss der AChE-Inhibition in diesen Kulturen erhalten zu können, wurden pro Kulturtage ausschließlich Kulturen miteinander verglichen, die aus einer Präparation, Behandlung und Färbung stammen. Je nach Alter und Inkubationszeit der Färbelösung können die Farbtöne der unterschiedlichen Kulturtage variieren. Daher sind die einzelnen Kulturtage untereinander in ihrer Farbintensität nicht vergleichbar. Innerhalb einer Versuchsreihe (Kontrolle und Behandlungen) kann jedoch anhand der Intensität der

---

Färbung eine Aussage über den Einfluss des Inhibitors auf die Bildung der einzelnen Matrices geschlossen werden.

---

#### 2.2.1.5 Verwendete Cholinesterase knockout Mausmutanten

---

Die in dieser Arbeit untersuchten AChE<sup>-/-</sup> BChE<sup>+/+</sup>, AChE<sup>+/+</sup> BChE<sup>-/-</sup> und AChE<sup>-/-</sup> BChE<sup>-/-</sup> Knockout Mäuse sind im Labor von Oksana Lockridge (University of Nebraska Medical Center) produziert und dieser Studie zur Untersuchung der Rolle der Cholinesterase in der Skelettentwicklung zur Verfügung gestellt worden. Alle von mir verwendeten Mäuse sind im dortigen Labor gezüchtet und genotypisiert worden. Von allen Embryonen wird zudem das Gewicht und das Alter bestimmt, bevor sie in 4% PFA/PBS pH 7,4 fixiert und per Luftpost in unser Labor geschickt worden sind.

Die verwendeten Knockoutmäuse wurden durch Gendelektionen und kombinierter Verpaarung unterschiedlicher Genotypen generiert. Bei der AChE<sup>+/+</sup> BChE<sup>+/+</sup> Knockoutmaus sind mittels Gen-Targeting die Exone 2,3,4 und 5 des *ACHE* Gens deletiert worden, so dass sie nicht mehr in der Lage ist das AChE-Protein zu synthetisieren. Die AChE<sup>-/-</sup> BChE<sup>+/+</sup> Maus ist anschließend durch die homologe Rekombination dieser Chimere produziert worden (Xie et al., 1999; Xie et al., 2000). In vorhergehenden Studien ist bereits gezeigt worden, dass diese Mausmutante weder im Gewebe noch im Plasma AChE-Aktivität produziert (Xie et al., 2000). Somit können alle gemessenen AChE-Aktivitäten auf exogen zugeführte AChE zurückgeführt werden. Die so entstandene AChE<sup>-/-</sup> BChE<sup>+/+</sup> Mauslinie ist im Stamm 129S6/SvEvTac isogenisch, aber selbst nicht mehr fortpflanzungsfähig. Aus diesem Grund wird diese Mauslinie durch die Verpaarung mit heterozygoten Mäusen aufrechterhalten. Von den aus der Verpaarung mit AChE<sup>+/+</sup> hervorgehenden Wurfgeschwistern des Genotyps AChE<sup>-/-</sup>, AChE<sup>+/+</sup> und AChE<sup>+/+</sup> werden die Embryonen des heterozygoten Genotyps für AChE (AChE<sup>+/-</sup>) in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Die AChE<sup>+/+</sup> BChE<sup>-/-</sup> Knockout Maus ist 2006 ebenfalls durch Gen-Targeting im Labor von Oksana Lockridge produziert worden (Li et al., 2006). Die entstandenen Chimären mit dem BChE<sup>-/-</sup> Allel sind mit Mäusen des 129S1/SvImJ (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) Stammes verpaart worden und haben Wurfgeschwister mit den Genotypen AChE<sup>+/+</sup> BChE<sup>+/+</sup> und AChE<sup>+/+</sup> BChE<sup>+/+</sup> hervorgebracht. Das *BCHE* Gen der Maus enthält 4 Exone, wovon ein Teil des Exon 2 in den BChE Mausmutanten deletiert wurde. Durch diese Deletion ist die

---

Spliceregion zwischen dem Intron 1 und dem Exon 2 und das gesamte Signalpeptide einschließlich der Translationsstartseite entfernt worden. Dabei ist auch Asp70, eine bedeutende Komponente der peripheren anionischen Seite (PAS), und Trp82, der Aminosäurerest, der für die Bindung der positiv geladenen Verbindungen an der aktiven Seite verantwortlich ist, deletiert worden. Durch diese Deletionen ist sichergestellt, dass in allen Geweben und auch im Plasma kein BChE-Protein mehr synthetisiert werden kann, was bereits in vorherigen Studien anhand von Southern Blots und Aktivitätsstudien nachgewiesen wurde (Li et al., 2006). Die AChE<sup>+/+</sup> BChE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen keinen ersichtlichen Phänotyp, sind aber im Gegensatz zu den AChE<sup>-/-</sup> BChE<sup>+/+</sup> Mäusen fertile, so dass diese Knockout-Linie durch die Verpaarung homozygoter Mäuse aufrechterhalten werden kann.

Durch die Verpaarung der Genotypen AChE<sup>+/+</sup> BChE<sup>-/-</sup> mit AChE<sup>+/-</sup> BChE<sup>-/-</sup> werden für die Vollständigkeit dieser Funktionsstudie auch Cholinesterase Doppel-Knockout-Mutanten generiert, welche die Genotypen AChE<sup>+/+</sup> BChE<sup>-/-</sup>, AChE<sup>+/-</sup> BChE<sup>-/-</sup> und AChE<sup>-/-</sup> BChE<sup>-/-</sup> aufweisen können. Hierbei ist besonders auffällig, dass alle AChE<sup>-/-</sup> BChE<sup>-/-</sup>-Mutanten direkt nach der Geburt (P0) sterben bzw. ohne ersichtliche Atembewegungen geboren werden. Die aus den verschiedenen Verpaarungen gewonnenen heterozygoten Mausmutanten sind im Verlauf dieser Arbeit nicht berücksichtigt worden.

---

## **2.2.2 Histochemische Färbungen**

---

### **2.2.2.1 Fixierung der Embryonen nach der Manipulation**

---

Die verwendeten Hühnerembryonen werden nach der Manipulation mit unterschiedlichen AChE Inhibitoren noch weitere 8-9 Tage (bis HH 37/38) im Brutschrank kultiviert und anschließend in 4% PFA/PBS pH 7.4 fixiert. Für die Fixierung müssen die Embryonen zuerst aus dem Ei in eine mit 1xPBS gefüllte Petrischale überführt werden. Hierfür werden die Hühnerembryonen mit einer gebogenen Pinzette aus dem Ei gehoben und in eine leere Petrischale gelegt. Dort wird der Embryo direkt dekapitiert und der restliche Körper in einer zweiten Schale mit 1xPBS gewaschen und das Stadium nach Hamburger und Hamilton bestimmt. Sobald das Herz aufgehört hat zu schlagen, wird der Embryo unmittelbar unter dem Brustkorb geteilt, da nur die oberen Extremitäten für die Auswertung verwendet werden. Alle inneren Organe müssen sorgfältig entfernt werden. Befindet sich der Embryo in einem späteren Entwicklungsstadium als HH 37/38, so müssen auch zusätzlich die Federn entfernt werden. Abschließend wird der Embryo nochmals in frischem 1xPBS gewaschen, bevor er in ein 50 mL Röhrchen mit ca. 20 mL 4% PFA/PBS pH 7,4 überführt und über Nacht bei 4°C fixiert wird. Die anschließende Lagerung bis zur weiteren Verwendung der Embryonen erfolgt ebenfalls in 4% PFA/PBS pH 7,4 bei 4°C.

---

#### **2.2.2.2 Knorpel-Knochen Färbung im Wholemount**

---

Für die Darstellung skelettaler und knorpeliger Strukturen im gesamten Embryo wird eine Alcianblau/Alizarinrot Wholemountfärbung durchgeführt. Durch die Alcianblau/Alizarinrot Kombinationsfärbung kann das Knorpelgewebe durch eine Blau-, und das Knochengewebe durch eine Rotfärbung dargestellt werden. Hierfür werden die im Kühlschrank gelagerten Proben (Hühnerembryonen und Mausmutanten) in 1x PBS überführt und über Nacht bei 4°C gewaschen. Anschließend wird der Mausembryo komplett gehäutet, wobei darauf zu achten ist, dass auch die Fingerspitzen großflächig von Haut befreit werden. Die Hühnerembryonen müssen nicht gehäutet werden, lediglich die Feder sollten ab HH 39 vor der Alcianblau/Alizarinrot Kombinationsfärbung entfernt werden. Danach werden die Proben für 24 h schüttelnd in der Alcianblau Färbelösung bei RT inkubiert. Überschüssige Farbreste werden durch eine absteigende Alkoholreihe von 2x 96%, 70%, 40% und 15% aus dem Gewebe entfernt und der Embryo zuletzt in Wasser gewaschen. Das Gewebe wird

---

anschließend in einer 1%igen Trypsinlösung verdaut, wobei die gefärbten Knorpelstrukturen deutlich durch das Gewebe zu erkennen sind. Anschließend werden die Proben für weitere 24 h schüttelnd in der Alizarinrot Färbelösung bei RT inkubiert. Danach wird das Gewebe in einer aufsteigenden 0,5% KOH/Glycerinreihe (Verhältnis 3:1, 1:1, 1:3) geklärt und bis zur Auswertung der Färbung in einer 1:3 0,5% KOH/Glycerinlösung bei 4°C gelagert.

---

#### **2.2.2.3 Refixierung von überfixiertem Gewebe**

---

Durch die Einfuhr der Mausembryonen aus dem Labor von Oksana Lockridge ist es im Verlauf dieser Arbeit dazu gekommen, dass die Mausembryonen zu lange in der 4% PFA-Lösung gelagert wurden. Durch die dadurch entstandene Überfixierung ist es zu einigen Problemen bei den unterschiedlichen histologischen Färbungen gekommen. So war das Gewebe z.B. nicht mehr für die Alzianblau/Alizarinrot Wholemountfärbung zugänglich, da der Farbstoff bereits im Bindegewebe hängen blieb und sich das Gewebe nicht mehr klären ließ.

Eine durch PFA entstandene Überfixierung kann jedoch mit Hilfe eines Citratpuffers wieder rückgängig gemacht werden. Der verwendete Citratpuffer besteht aus 0,01 M Zitronensäure-Monohydrat und wird auf einem pH-Wert von 6.0 eingestellt. Das überfixierte Gewebe wird für ca. 6 Stunden bei 65-70°C in diesem Puffer inkubiert. Anschließend können entsprechende Färbungen, wie gewohnt, durchgeführt werden. Der Citratpuffer ist in der Lage, die vernetzten Proteine wieder zu lösen und somit die Fixierung rückgängig zu machen.

---

#### **2.2.2.4 Färbung der Cholinesteraseaktivität mittels Karnovsky-Roots im Wholemount**

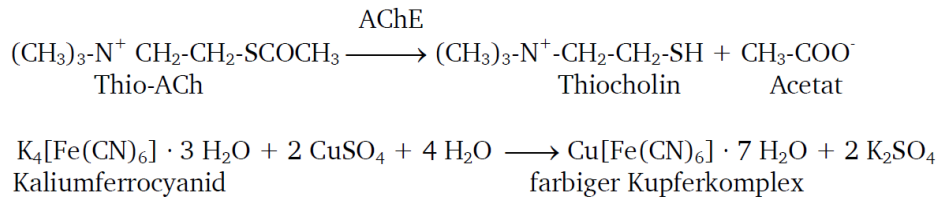
---

Mit Hilfe der Karnovsky-Roots Färbemethode (modifiziert nach Karnovsky und Roots, 1964) kann die enzymatische Aktivität von Cholinesterasen histochemisch nachgewiesen werden. Die Färbereaktion beruht auf einer chemischen Umsetzung eines Schwefelanalogs des eigentlichen Substrates dieser Enzyme zu einem dunklen, unlöslichen Kupferkomplex. Als Substrat werden entweder Acetylthiocholiniodid (ATC) für die AChE-Färbung oder Butyrylthiocholiniodid (BTC) für die BChE-Färbung eingesetzt. Für die Inhibition des jeweils nicht nachzuweisenden Enzyms werden die bekannten Inhibitoren iso-OMPA ( $10^{-2}$  M iso-OMPA) und BW284c51 ( $10^{-2}$  M BW284c51) eingesetzt, wobei iso-OMPA die BChE und BW284c51 die AChE inhibiert. Die Funktionsweise der Färbung beruht auf dem Prinzip einer



---

Enzymreaktion mit anschließender Folgereaktion, bei welcher ein unlöslicher Farbniederschlag entsteht. Die AChE spaltet hierbei das Acetylthiocholiniodid (ATC) zu Acetat und Thiocholin. Das Thiocholin wiederum reduziert das Ferricyanid zu Ferrocyanid, welches sich mit den Kupferionen zu einem dunkelbraunen, unlöslichen Kupferpräzipitat verbindet (Hatchett's Braun). Diese Art der Färbung ist sehr stabil und ermöglicht aufgrund der enzymatischen Teilreaktion eine spezifische Lokalisation der Esterasen im Gewebe.



Für die Durchführung der Färbereaktion werden die im Kühlschrank gelagerten Embryonen zuerst für 5 h in PBS gewaschen um die PFA Reste von der Fixierung und Lagerung zu entfernen. Anschließend werden die Embryonen über Nacht bei 4°C in 0,5% PBST inkubiert. Dadurch permeabilisiert die Membran der Gewebe und die einzelnen Strukturen werden der Färbung zugänglich gemacht. Danach wird das PBST durch den Tris-Maleat-Puffer mit 1% Triton X-100 ersetzt und das Gewebe für die anschließende Färbung bei 4°C über Nacht präaquilibriert. Vor der Färbereaktion müssen die Embryonen noch für 5 h in Tris-Maleat Puffer gewaschen werden um alle Tritonreste aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend wird die Karnovsky-Roots Färbelösung zu den Geweben gegeben. Die Farbreaktion erfolgt für 2-6 h bei 37°C unter Lichtabschluss auf einem Schüttler, um ein gleichmäßiges Färben der Wholemounts zu gewährleisten. Nach der Färbereaktion werden die Embryonen 2x 5 min in 1x PBS gewaschen und anschließend dokumentiert. Für eine längere Lagerung können die Embryonen in 4% PFA bei 4°C gelagert werden.

---

#### 2.2.2.5 Herstellung von Gefrierschnitten

---

Für die histologischen und immunhistochemischen Analysen der manipulierten Hühnerembryonen und der bereitgestellten Mausmutanten müssen von den Extremitäten 12 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt werden. Hierfür werden die im Kühlschrank gelagerten Proben (Hühnerembryo bzw. Mausmutante) zuerst 2x in 1xPBS gewaschen und anschließend in eine 30%ige Saccharoselösung überführt und für 72-96 h bei 4°C inkubiert. Die Saccharoselösung wird dabei täglich durch frische ersetzt. Nach der entsprechenden

---

Inkubationszeit hat sich das Gewebe vollständig mit Saccharose vollgesogen und es bilden sich bei den anschließenden Gefrierprozessen keine spitzen Eiskristalle, die das Gewebe zerstören würden. Zur Herstellung von den Gefrierschnitten werden die Extremitäten der Mäuse bzw. Hühnerembryonen abgetrennt und in die mit Tissue-Tek<sup>®</sup> gefüllte Einbettungsform aus Silikon (Polysciences) überführt. Anschließend wird das Gewebe im Tissue-Tek<sup>®</sup> bei -30°C im Kryostaten tiefgefroren. Sobald das Tissue-Tek<sup>®</sup> mit dem Gewebe durchgefroren ist, kann es aus der Einbettform herausgenommen und mit einem weiteren Tropfen Tissue-Tek<sup>®</sup> so auf dem Objektisch aufgefroren werden, dass von den Extremitäten 12 µm dicke Frontalschnitte angefertigt werden können. Die angefertigten Gefrierschnitte werden auf Superfrost Plus Objektträger aufgenommen und für 2-3 h bei 37°C getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung können die Objektträger bei -20°C gelagert werden.

---

#### **2.2.2.6 Hämatoxylin/Eosin-Kombinationsfärbung**

---

Die Hämatoxylin/Eosin Kombinationsfärbung (HE) gehört zu den gebräuchlichsten Übersichtsfärbungen in der Gewebehistologie und ermöglicht eine Unterscheidung der untersuchten Strukturen in normal, entzündlich- oder pathologisch-veränderte Strukturen. Als Färbelösungen werden die Hämatoxylinlösung für die Kernfärbung und die Eosinlösung für die Cytoplasmafärbung genutzt. Hämatoxylin ist ein bei niedrigem pH Wert positiv geladener Farbstoff, der negativ geladene basophile Strukturen, wie z.B. die DNA des Kernchromatins, die RNA des endoplasmatischen Retikulums aber auch die sauren Glykosaminoglykane des hyalinen Knorpels, blau bis violett anfärbt. Eosin ist ein negativ geladener azidophiler Farbstoff, der zur Gegenfärbung des Gewebes herangezogen wird. Dabei werden die Strukturen wie Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten rot gefärbt.

Für die Durchführung der histologischen Färbung werden die bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte auf Raumtemperatur gebracht und vor der Färbung in Aqua dest. gewaschen, um alle Reste des Einfriermediums zu entfernen. Danach werden die Schnitte für 5 min mit Mayers-Hämatoxylin gefärbt und anschließend für 10 sec in 0,1% Salzsäure in Ethanol (70%) differenziert. Für die typische Hämatoxylinfärbung muss das Gewebe für etwa 5-10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut werden. Die Gegenfärbung erfolgt dann für 10 min in 0,5% wässriger Eosin-G Lösung. Um die überflüssigen Farbreste zu entfernen, werden die Schnitte anschließend mit Aqua dest. gewaschen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe können

---

die Gewebe für jeweils 2 min in Ethanol (50%, 70%, 96%), Isopropanol sowie Xylol entwässert und anschließend mit Eukitt (Sigma) eingedeckt werden.

---

#### **2.2.2.7 Alcianblaufärbung**

---

Die Alcianblaufärbung besitzt in der Histologie eine große Bedeutung, da es mit dieser Färbemethode möglich ist sauren Mukosubstanzen (Glykosaminglykane) nachzuweisen. Alcianblau ist ein positiv geladener Kupferfarbstoff, der saure, sulfatreiche Proteo- und saure Glykosaminoglykanen der ECM blau anfärben kann. Anhand des pH Wertes können bei dieser Färbemethode einzelne Knorpelmatrixkomponenten unterschieden werden. So färbt die Alcianblaufärbung bei einem niedrigem pH von 1,0 nur die stark sulfatierten, sauren Proteo- und Glykosaminoglykane (GAG), während bei einem höheren pH von 2,5 die sauren carboxylierten und schwach sulfatierten Mucosubstanzen (Glykoproteine, Mucopolysaccharide) selektiv gefärbt werden.

Für die Durchführung der histologischen Färbung werden die bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte auf Raumtemperatur gebracht und vor der Färbung in Aqua dest. gewaschen, um alle Reste des Einfriermediums zu entfernen. Danach werden die Schnitte für 10 min in 0,1 M HCl Lösung (pH 1.0) bzw. 3%iger Essigsäurelösung (pH 2.5) präinkubiert. Anschließend erfolgt die Alcianblaufärbung (pH 1.0 bzw. pH 2.5) für 60 min bei RT. Die Schnitte werden nach der Färbung für 1 min in Aqua dest. gewaschen und für 3-5 min mit Kernechtrot gegengefärbt. Abschließend werden die Schnitte nochmal für 2 min in Wasser gewaschen und dann mit Kaiser's Glycerin (Merck) eingedeckt. Mit Hilfe der Alcianblau/Kernechtrot Kombinationsfärbung können die Zellkerne rosa-rot, das Zytoplasma blassrot und die stark sauren sulfatierten bzw. sauren carboxilierten Bestandteile der Knorpelmatrix blau angefärbt werden.

---

#### **2.2.2.8 Alizarinrotfärbung**

---

Bei der Alizarinrot Färbung handelt es sich um eine sehr spezifische und sensitive Nachweismethode von Kalziumablagerungen in Knochengeweben (Dahl, 1952; McGee-Russell, 1958). Alizarinrot bildet mit zweiwertigen Kationen Chelatverbindungen aus und stellt so unter anderem die Kalziumverbindungen der Knochenmatrix rot-violett dar. Um Diffusionsartefakte der in saurer Lösung gut löslichen Kalziumionen weitgehend zu

---

verhindern, wurde ein basischer pH-Wert der Färbe- und Pufferlösungen gewählt (pH 9,0). Die damit erreichte langsame Freisetzung der Kalziumionen garantiert eine ortstgetreue Farbstoffbindung. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurde im Anschluss eine Hämatoxiniln Färbung durchgeführt.

Für die Färbung werden die Gefrierschnitte zuerst auf Raumtemperatur gebracht und anschließend in Aqua dest. gewaschen. Danach werden die Schnitte für 1 h in der 2%igen Alizarinrotlösung bei RT gefärbt. Überschüssige Farbreste werden durch das Waschen mit Aqua dest. entfernt. Für die Gegenfärbung der Zellkerne werden die Schnitte für 1 min in Mayers Hämatoxylin gefärbt. Das Bläuen erfolgt anschließend für 2 min unter fließendem Leitungswasser. Zum Schluss werden die Schnitte nochmal für 2 min in Aqua dest. gewaschen und dann mit Kaiser's Glycerin (Merck) eingedeckt. Die kalzifizierte extrazelluläre Matrix der Knochengewebe erscheint bei dieser Färbemethode rot-violett, während die Zellkerne blau gefärbt sind.

---

#### **2.2.2.9 Alkalische Phosphatase-Färbung**

---

Die alkalische Phosphatase (ALP) spielt beim Aufbau des Knochengewebes eine wesentliche Rolle und wird von den Osteoblasten in großen Mengen für den Knochenaufbau benötigt. Die ALP kann von den Osteoblasten teilweise selbst produziert werden, wird aber durch den hohen Bedarf meist noch zusätzlich aus dem Blutkreislauf bezogen. Durch die Spaltung des anorganischen Pyrophosphats durch die ALP wird das Phosphat aus der Verbindung freigesetzt und steht dem Knochenaufbau anschließend zur Verfügung. Zusammen mit Calcium wird in den Osteoblasten daraus das Knochenmineral Hydroxylapatit gebildet.

Für die Durchführung der Färbung werden die Gefrierschnitte zuerst auf Raumtemperatur gebracht und anschließend in Aqua dest. gewaschen. Danach werden die Schnitte 30 min im Alkalische Phosphatase Puffer präinkubiert. Anschließend erfolgt die Färbereaktion unter Lichtabschluss. Als Färbelösung wird eine BCIP/NBT-Lösung (3,5 µL BCIP + 4,5 µL NBT/mL Alkalische Phosphatase Puffer) verwendet, die von der alkalischen Phosphatase zu einem blauen Präzipitat umgesetzt wird. Die Färbelösung wird alle 20 min durch frische Lösung ersetzt, bis eine spezifische Färbung des Gewebes zu erkennen ist. Durch das Waschen in PBST wird die Färbereaktion bei gewünschter Intensität abgestoppt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt anschließend mit einer Kernechtrotfärbung für

---

3-5 min. Abschließend werden die Schnitte nochmal für 2 min in Wasser gewaschen und dann mit Kaiser's Glycerin (Merck) eingedeckt.

---

#### **2.2.2.10 Toluidinblaufärbung**

---

Die Toluidinfärbung ist eine einfache und schnelle histologische Färbemethode, mit der sich eine Vielzahl von Zellen und Gewebe in unterschiedlichen Blautönen darstellen lassen. Toluidinblau ist ein metachromatischer, basischer Thiazinfarbstoff, der die Zellen, die Kollagenfasern und die verkalkte Knorpelmatrix unterschiedlich blau anfärbt. Die nicht-mineralisierte Knorpelmatrix, sowie die Mastzellengranula werden rotviolett dargestellt, während die mineralisierte Hartgewebematrix (Knochen) ungefärbt bleibt.

Für die Färbung werden die bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte zuerst auf Raumtemperatur gebracht und anschließend in Aqua dest. gewaschen, um das restliche Einfriermedium zu entfernen. Danach werden die Schnitte 5 min in Toluidinblau gefärbt. Die Differenzierung der Färbung erfolgt in 30 sec Schritten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und Isopropanol). Anschließend werden die Schnitte bei RT getrocknet und in Eukitt (Sigma) eingedeckt.

---

#### **2.2.3 *In situ* Hybridisierung**

---

Die *In situ* Hybridisierung ist eine molekularbiologische Methode, mit deren Hilfe es möglich ist Expressionsmuster bestimmter Gene in einzelnen Zellen oder ganzen Geweben nachzuweisen. Eine künstlich hergestellte mit Digoxigenin-markierte antisense mRNA-Sonde, welche komplementär zu der zu untersuchenden mRNA Probe ist, wird zu diesem Zweck auf das Gewebe gegeben. Über Basenpaarungen hybridisiert die Sonde mit der nachzuweisenden mRNA. Die Markierung der antisense mRNA-Sonde mit Digoxigenin ermöglicht über anschließende Färbeschritte die Visualisierung der entsprechenden Genexpression durch die Spaltung eines Farbstoffes. Die Methode der *in situ* Hybridisierung kann sowohl an Gewebeschnitten als auch an Ganzkörperpräparaten (wholemounds) durchgeführt werden.

---

### 2.2.3.1 Präparation der Plasmid-DNA: Maxipräparation (alkalische Lyse mit SDS)

---

Bakterien (*E. coli*) werden mit einer Vielzahl von Plasmiden, in denen die Sondensequenzen enthalten sind, transformiert, um die Plasmid-DNA in diesem Wirtsorganismus auf einfache Art und Weise zu vervielfältigen. Zusätzlich ist in den Plasmiden ein spezifisches Antibiotika-Gen integriert (Ampicillin), das als Selektionsmarker die Unterscheidung von transformierten und nicht-transformierten Bakterien ermöglicht.

Mit Hilfe einer Präparation der Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse kann die auf diese Weise vervielfältigte Sonde in einer Vielzahl von Färbungen eingesetzt werden. In dieser Arbeit werden Sonden gegen Ihh, Kollagen Typ II und X und MMP-13 (Sonden stammen aus dem Labor von A. Vortkamp) verwendet.

#### Durchführung:

Bevor die Sonde aus den Wirtsbakterien isoliert werden kann, muss zuerst eine über Nacht Kultur der Bakterien angesetzt werden, in der sich die Bakterien samt der transformierten Plasmide stark vermehren können. Dazu werden 20 mL LB-Medium mit 20 µL Ampicillin (100 mg/mL) in ein 50 mL Polypropylen-Reaktionsgefäß gefüllt und mit einer Pipettenspitze einen kleiner Teil einer tiefgefrorenen Bakterienkultur (*E. coli*-Stamm DH5α; mit den entsprechenden Sonden transformiert) hinzugeben. Die 50 mL Polypropylen-Reaktionsgefäße werden über Nacht bei 37 °C und 225 rpm in einem Schüttler inkubiert.

Am folgenden Tag findet die eigentliche Plasmidisolierung statt. Dazu werden je zwei 15 mL Polypropylen-Reaktionsgefäße mit 10 mL der Bakterienkultur befüllt und für 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das überstehende Medium wird gut abgesaugt, denn Reste des Mediums können die späteren Isolationsschritte negativ beeinflussen. Das Bakterienpellet wird anschließend in 200 µL eiskalter Alkaline Lysis Solution I und RNase A (10 µl RNase A zu 1 mL Alkaline Lysis Solution I) resuspendiert (vortexen) und für 2-3 min auf Eis inkubiert. Die Proben aus den 15 mL Polypropylen-Reaktionsgefäßen werden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und 400 µL der Alkaline Lysis Solution II hinzugeben. Die Lösung wird 15 mal durch invertieren gemischt (nicht vortexen !!) und für 2-3 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 300 µL der Alkaline Lysis Solution III hinzugegeben und die Lösung für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Proben werden dann für 5 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Danach wird das gleiche Volumen an

---

Phenolchloroform hinzugeben (ca. 600 µl), die Lösung gut gemischt (vortexen) und die Probe für 2 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren haben sich zwei Phasen gebildet. In der unteren, organischen Phase befinden sich die restlichen präzipitierten Proteine, in der oberen, wässrigen Phase ist das Plasmid mit der Sonde enthalten.

Die obere, wässrige Phase wird in ein frisches, gut beschriftetes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden 600 µL Isopropanol hinzugegeben und die Lösung gut gemischt (vortexen). Die Proben werden für 2 min bei RT inkubiert und danach für 7 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 1 mL 70%igen Ethanol gewaschen, aber nicht resuspendiert. Der Überstand wird wieder abgesaugt und das Pellet bei RT trocknen gelassen, bis der gesamte Ethanol verdampft ist. Anschließend wird das Pellet in 50 µL nukleasefreiem Wasser gelöst.

Für die Überprüfung der erfolgreichen Aufreinigung der Plasmid-DNA wird ein 0,8% Agarosegel mit 1,5 µL der Plasmid-DNA, 0,5 µL Ladepuffer (in Glycerin) und 8 µL dH<sub>2</sub>O beladen und für 45 min bei 90V laufen gelassen. Das Gelbild ermöglicht es im Anschluss eine Aussage über die Qualität und Quantität der Plasmidaufreinigung zu treffen. Für die daran anschließenden Schritte der Sondenherstellung wird der DNA-Gehalt der Lösung photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt.

---

### 2.2.3.2 Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonde

---

Für die Herstellung der eigentlich für die Hybridisierung zu verwendenden Sonde muss die Plasmid-DNA in einem ersten Schritt linearisiert werden. Dies geschieht mit Hilfe eines Restriktionsverdaus.

Durchführung:

2-4 µg	Template-DNA (Plasmid aus oben beschriebener Maxi-Präp.),
10 µL	10xPuffer (entsprechend dem Enzym),
10-20 U	Restriktionsenzym (Enzym dem Materialteil entnehmen),
+/- 10 µL	10x BSA (nicht bei allen Enzymen notwendig),
	mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 100 µL auffüllen.

Der so angesetzte Restriktionsverdaus muss für mindestens 3 h bei 37°C inkubiert werden.

---

Nachdem das Plasmid nach dem Verdau linearisiert ist, muss es mittels einer Phenol-Chloroform Extraktion wieder aufgereinigt werden.

Hierzu wird zu dem Restriktionsverdau in gleichen Teilen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol dazugegeben (100 µL Restriktionsansatz + 100 µL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) und beide Phasen im Vortexer kräftig gemischt. Anschließend werden die Phasen bei einer Zentrifugation von 14.000 rpm für 5 min wieder getrennt und die obere, wässrige Phase in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Danach werden 100 µL (= 1 Volumen) Chloroform zur wässrigen Phase gegeben und abermals durch vortexen gemischt. Direkt im Anschluss werden noch 10 µL (= 1/10 Volumen) 3 M Na-Acetat (pH 5,2) dazugegeben und durch vortexen gemischt. Durch die Zugabe von 330 µL (= 3 Volumen) eiskaltem 100% Ethanol wird die DNA bei -20°C über Nacht gefällt. Anschließend wird das Pellet für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet ist kann es in 50 µL DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert werden.

Im folgenden Schritt findet die eigentliche Markierung der Sonde mit Digoxigenin statt. Hierfür wird ein Dig-Nucleotid Mix über eine *in vitro* Transkription in die Sonde eingebaut.

Durchführung der Sondensynthese:

2-4 µg	linearisierte DNA,
4 µL	5x Polymerasepuffer,
2 µL	100 mM DTT (Endkonzentration 10 mM),
2 µL	Dig-Nucleotid Mix (enthält 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP und 3,5 mM DIG-UTP)
2 µL	RNase Inhibitor (10 U)
2 µL	Polymerase (Polymerase aus dem Materialteil entnehmen) mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 20 µL auffüllen.

Der gesamte Transkriptionsansatz wird für 2-3h bei 37°C inkubiert. Direkt im Anschluss wird 1 µL DNase dazu pipettiert und der Ansatz für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Transkription muss die RNA-Sonde nur noch mittels Ammoniumacetat gefällt werden. Dies geschieht durch die Zugabe von 100µL DEPC-H<sub>2</sub>O, 50 µL (= ½ Volumen) 7,5 M NH<sub>4</sub>Acetat und 450 µL (= 3 Volumen) 100% Ethanol. Die RNA wird in dem angesetzten Reaktionsmix bei -20°C über Nacht gefällt. Anschließend wird das Pellet für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen kann die RNA-Sonde in 20 µL DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert werden und ist für die *in situ* Hybridisierung gebrauchsfertig.



---

### 2.2.3.3 *In situ* Hybridisierung an Gefrierschnitten

---

Die *in situ* Hybridisierung an den Gefrierschnitten wurde nach einem geringfügig modifizierten Protokoll von Reißmann et al. durchgeführt (Reißmann et al., 1996).

In einem ersten Schritt werden die zu färbenden Gefrierschnitte auf Raumtemperatur gebracht und anschließend in eine mit Waschpuffer gefüllte *in situ*-Box gegeben. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Objektträger nicht mit dem Waschpuffer in Kontakt kommen. Die Sonde wird währenddessen im Verhältnis 1:100 im Hybridisierungspuffer verdünnt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Anschließend werden pro Objektträger (OT) 120 µl der Sonde aufgetragen und jeder OT mit einem Deckglas abgedeckt. Die so behandelten Schnitte werden über Nacht bei 68°C im Wärmeschränk inkubiert.

Am folgenden Tag wird der Waschpuffer bei 68°C vorgewärmt und die OTs anschließend in einer Glasküvette für 1 h mit dem Waschpuffer gewaschen. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Deckgläser ohne die Gewebeschnitte zu beschädigen vom Objektträger abschwimmen. Anschließend werden die OTs eine weitere Stunde in einer mit MABT (auf RT) gefüllten Glasküvette gewaschen. Direkt im Anschluss werden die Gewebeschnitte für eine Stunde in einem Gemisch aus 20% CS in MABT geblockt. Währenddessen wird der an die Alkalische Phosphatase gekoppelt anti-digoxigenin-Antikörper in der Blocklösung (1:3000) verdünnt und 1 h auf Eis präinkubiert. Anschließend werden 120 µl des vorverdünnten Antikörpers auf die Objektträger aufgetragen und jeder mit einem Deckglas abgedeckt und über Nacht bei RT inkubiert.

Am nächsten Tag müssen die OTs für 1 h in einer mit MABT gefüllten Glasküvette gewaschen werden. Auch hier ist darauf zu achten, dass die Deckgläser ohne die Gewebeschnitte zu beschädigen vom Objektträger abschwimmen. Anschließend werden die OTs für die nachfolgende Farbreaktion zweimal für 10 min im Alkalische Phosphatase Puffer präinkubiert. Die anschließende Färbereaktion wird durch die Zugabe der BCIP/NBT Farblösung (3,5 µL BCIP + 4,5 µL NBT/mL Alkalische Phosphatase Puffer) im Dunkeln durchgeführt. Die Farbreaktion muss hierbei alle 20 min begutachtet und die Färbelösung bei Bedarf erneuert werden, da es sonst zu einer erhöhten Hintergrundfärbung kommt. Hat die Farbreaktion die gewünschte Stärke erreicht wird sie durch zweimaliges waschen in PBST gestoppt. Anschließend werden die Schnitte bei RT getrocknet und in Kaiser's Glycerin eingedeckt und bei RT gelagert.

---

## 3 Ergebnisse

---

### 3.1 Manipulationen am Modellsystem Huhn

---

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle des nicht-neuronalen cholinergen Systems in der Regulation der Skeletogenese näher zu untersuchen. In einer Vielzahl von Studien konnten bereits unterschiedliche Komponenten des nicht-neuronalen cholinergen Systems in den Skelettstrukturen nachgewiesen werden. Bis heute gibt es jedoch noch keine Expressionsstudie zur AChE über den gesamten Zeitraum der frühen Extremitätenentwicklung hinweg. Daher ist zu Beginn dieser Arbeit eine detaillierte Studie zur zeitlichen und räumlichen Expression der AChE während der frühen embryonalen Extremitätenentwicklung im Huhn durchgeführt worden. Im Anschluss daran wurden „loss of function“-Experimente der Acetylcholinesterase *in ovo* mit Hilfe verschiedener AChE-Inhibitoren durchgeführt um eine mögliche Funktion dieses Enzyms in der endochondralen Ossifikation zu identifizieren und eine Aussage darüber treffen zu können, ob diese Funktion über die Enzymaktivität oder die Funktion als Zelladhäsionsmolekül vermittelt wird.

---

#### 3.1.1 Räumliches und zeitliches Aktivitätsmuster der AChE während der frühen embryonalen Extremitätenentwicklung

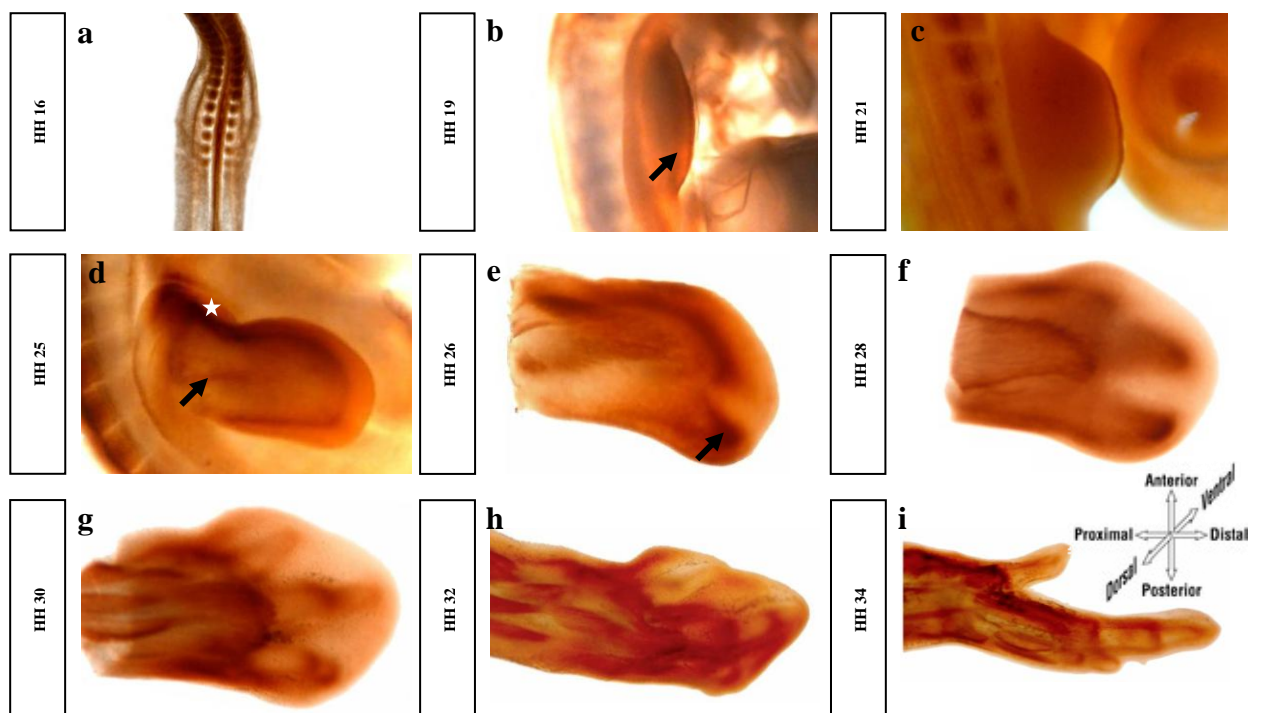
---

Der histochemische AChE Nachweis erfolgt in dieser Aktivitätsstudie mit Hilfe der Karnovsky-Roots Färbemethode (siehe im Methodenteil S. 44). Hierbei wird speziell auf die AChE Aktivität in den vorderen Extremitätenknospen von Hühnerembryonen der Entwicklungsstadien HH 16 bis HH 34 eingegangen.

In Abbildung 17 ist die AChE Aktivität deutlich an der intensiven Braunfärbung (Hatchett's Braun) zu erkennen. Bereits im Entwicklungsstadium HH 16 zeigt sich in den Wholemounts eine ausgeprägte Färbung der AChE in den Somiten und im vorderen Bereich des Ektoderms der Flügelknospen (siehe Abbildung 17 a). Aus diesem Bereich geht während der weiteren Entwicklung der Flügelanlage die apikale ektodermale Randleiste (AER) hervor, die ebenfalls eine sehr starke AChE Aktivität aufweist (siehe Abbildung 17 b). Direkt unter der AER befindet sich im Entwicklungsstadium HH 19 eine zweite bogenförmige Struktur, die ebenfalls eine deutliche, wenn auch schwächere AChE Aktivität aufzeigt (siehe Abbildung 17 b, Pfeil). Die Flügelanlage wächst mit den zunehmenden Entwicklungsstadien nach distal aus und zeigt eine vermehrte, flächig verteilte AChE Aktivität im Ektoderm.

Während dieses Entwicklungsprozesses bleibt das Aktivitätsmuster in der AER unverändert (siehe Abbildung 17 c). Während der weiteren Entwicklung verlängert sich die bogenförmige Struktur mit dem Längenwachstum der Flügelanlage und bildet im späteren Verlauf eine hufeisenförmige Form (siehe Abbildung 17 d), welche die zu diesem Zeitpunkt startenden Mesenchymverdichtungen umschließt. Bei der Betrachtung der AChE Aktivität ist deutlich zu erkennen, dass die hufeisenförmige Struktur auf der proximo-anterioren Seite die stärkste Aktivität aufzeigt (siehe Abbildung 17 d, weißer Stern). Zu diesem Zeitpunkt dringt der Spinalnerv, der ebenfalls eine deutliche AChE Aktivität aufweist, von der proximalen Seite in die Wurzel der Extremitätenanlage vor (siehe Abbildung 17 d, Pfeil). Zeitgleich geht die Aktivität in der Randleiste langsam verloren.

Während der weiteren Entwicklung der Flügelanlagen ist die AChE Aktivität stark auf das mesenchymale Knochenblastem konzentriert, aus dem sich im Entwicklungsstadium HH 26 langsam die Fingerstrahlen separieren. Hierbei zeigt sich vor allem, dass die stärkste AChE Aktivität in den Spitzen der Fingerstrahlen lokalisiert ist (siehe Abbildung 17 e, Pfeil).



**Abbildung 17: Räumliches und zeitl. AChE-Aktivitätsmuster in der frühen Extremitätenentwicklung**

Dargestellt ist der histochemische Nachweis der AChE Aktivität mittels der Karnovsky Roots Färbemethode. Die AChE Aktivität ist an einer intensiven Braunfärbung zu erkennen. Die abgebildeten Wholemount-Färbungen der Entwicklungsstadien HH 16-34 sind in dorsaler Aufsicht gezeigt. Details zur räumlichen und zeitlichen Veränderung der AChE Aktivität sind dem Text zu entnehmen.

---

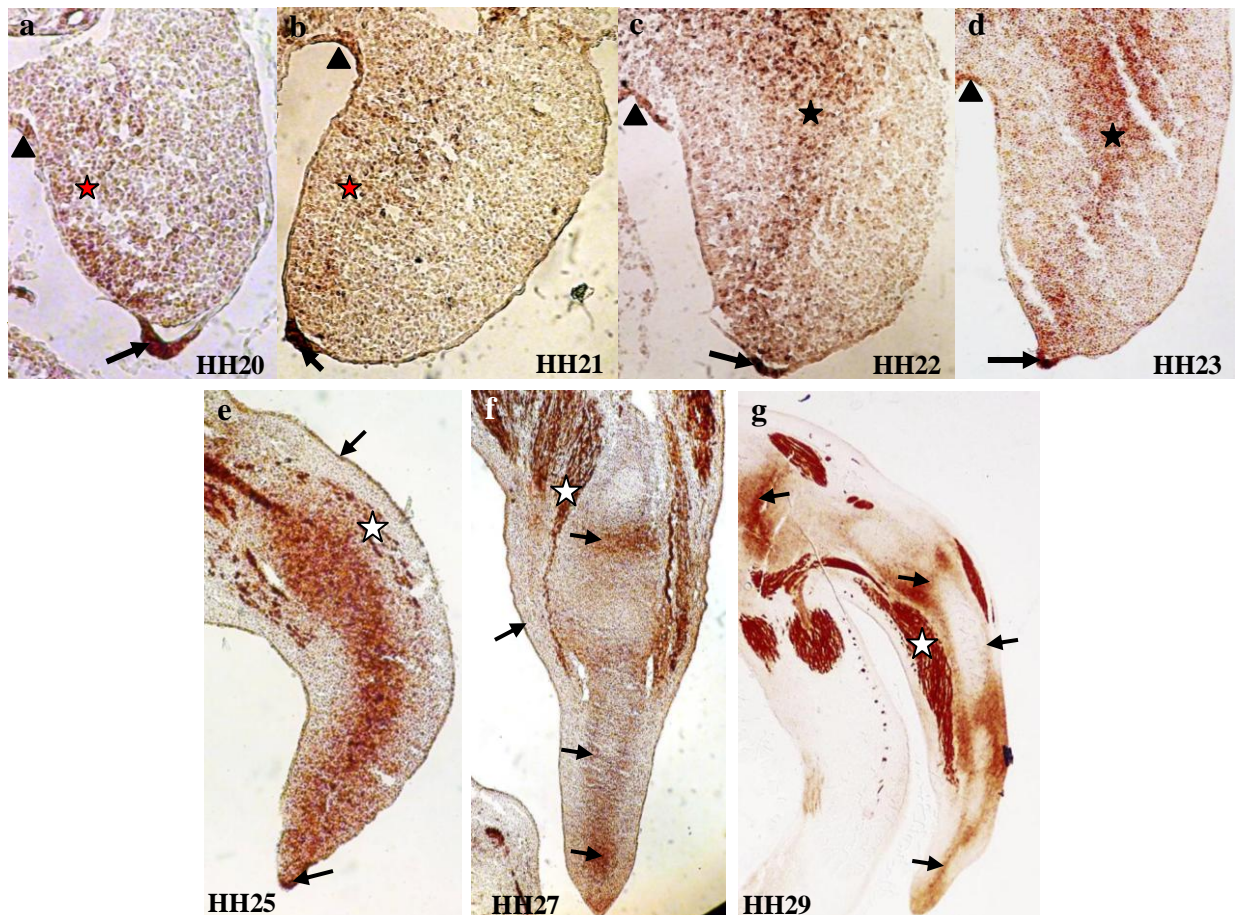
Ab dem Entwicklungsstadium HH 26 sind der einwandernde Spinalnerv und die Muskelzellen, die im Verlauf faserige Strukturen bilden, deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 17 e-i). Während der weiteren Determination der Skelettelemente zeigt sich eine erhöhte AChE Expression in den Fingerspitzen und den Gelenkbereichen, während die interdigitalen Bereiche keine AChE Aktivität aufweisen (siehe Abbildung 17 f und g). Dies ändert sich jedoch in den späteren Entwicklungsstadien. Ab dem Entwicklungsstadium HH 32 ist ein deutlicher Anstieg der AChE Aktivität in den interdigitalen Bereichen zu erkennen (siehe Abbildung 17 h), der sich vom distalen zum proximalen Bereich hin ausbreitet. Im Entwicklungsstadium HH 34 sind die Flügelextremität und die Skelettelemente bereits vollständig determiniert. Hier zeigt sich die AChE Expression besonders deutlich in den Gelenkbereichen der Fingerknochen und dem Perichondrium bzw. Periosteum (siehe Abbildung 17 i).

Die durchgeführten Wholemout-Färbungen geben einen ersten Überblick über die Lokalisation der AChE während der Skelettentwicklung. Für eine genauere Bestimmung der Wirkungsorte werden jedoch zusätzlich noch Gefrierschnitte zu den einzelnen Entwicklungsstadien angefertigt und auf ihre AChE-Aktivität hin untersucht. Die durchgeführten Gefrierschnitte sind in transversaler oder frontaler Schnittrichtung (siehe Bildunterschrift) angefertigt worden.

In den in Abbildung 18 dargestellten Gefrierschnitten der oberen Reihe ist deutlich die bereits in den Wholemout-Präparaten beschriebene AChE Aktivität in der AER zu erkennen (siehe Abbildung 18 a-d, Pfeil). Zusätzlich zeigt sich in diesen Schnitten im ventralen Mesenchym der Flügelknospe eine erhöhte AChE Expression (siehe Abbildung 18 a und b, roter Stern). Während der weiteren Entwicklung wächst die Extremitätenknospe weiter aus und die AChE Aktivität verlagert sich mehr in den zentralen Teil des Mesenchyms. Hier ist die höchste Aktivität deutlich in den Bereichen der kondensierenden mesenchymalen Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 18 c und d, schwarzer Stern). Darüber hinaus findet sich auch im angrenzenden Ektoderm eine deutliche AChE Aktivität, die auf der ventralen Seite der Flügelknospe im posterioren Bereich des Ektoderms besonders stark zu sein scheint (siehe Abbildung 18 a-d, Pfeilspitze).

Während der weiteren Entwicklung nimmt die AChE Aktivität in der gesamten Flügelknospe stark zu (siehe Abbildung 18 e-g). Im Stadium HH 25 ist sie besonders im Bereich des kondensierenden Knorpels stark erhöht (siehe Abbildung 18 e). Während sich aus den

kondensierenden mesenchymalen Zellen langsam die Knorpelanlagen determinieren, nimmt die AChE Aktivität in diesem Bereich deutlich ab (siehe Abbildung 18 f). Lediglich in den Gelenkbereichen, im angrenzenden Perichondrium und in den Knorpelbereichen der Fingerspitzen zeigt sich auch weiterhin eine erhöhte Aktivität (siehe Abbildung 18 f und g, Pfeil).



**Abbildung 18: Räumliches und zeitl. AChE-Aktivitätsmuster an Gefrierschnitten der Stadien HH 20-29**

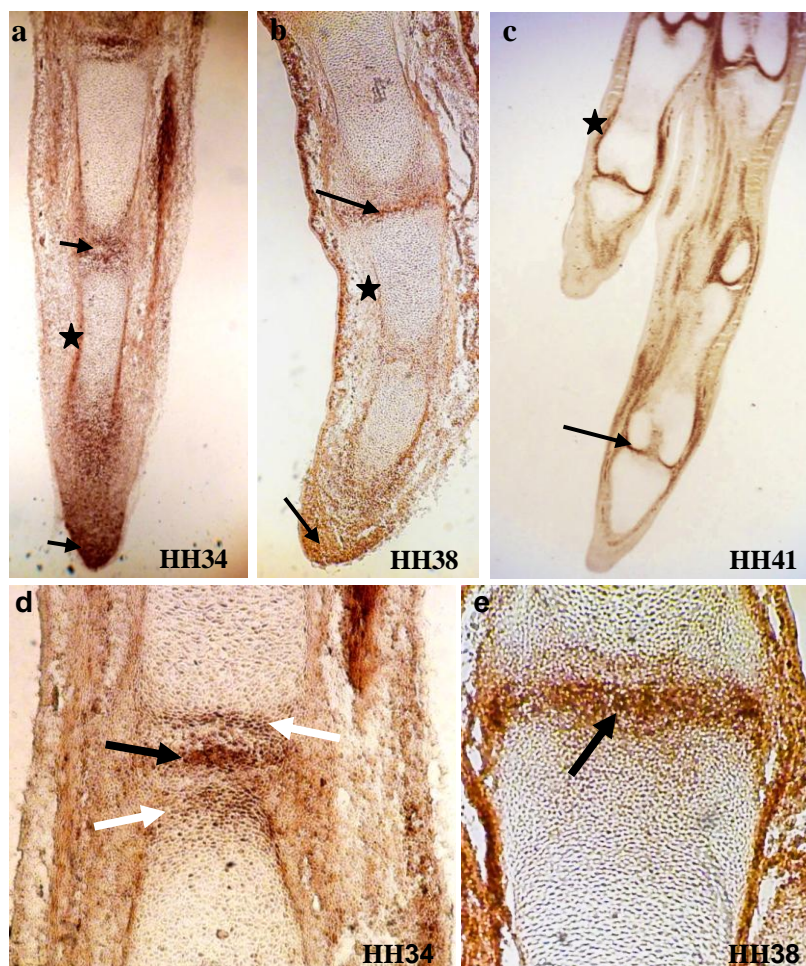
Dargestellt sind 12 µm dicke Transversalschnitte der Flügelknospe der Stadien HH 20-29 im Huhn. Die in der oberen Reihe dargestellten Schnitten weisen eine deutliche AChE Aktivität in der AER (Pfeil) auf. In den frühen Stadien tritt die AChE vor allem im ventralen Mesenchym (roter Stern) auf, während in den späteren Stadien diese Aktivität verstärkt im zentralen Mesenchym lokalisiert ist (schwarzer Stern). Die AChE Aktivität im Ektoderm ist besonders stark im ventral-proximalen Bereich lokalisiert (Pfeilspitze). Zu HH 25 tritt sie besonders stark im Bereich des kondensierenden Knorpels auf, während sie in den folgenden Stadien langsam in der AER verloren geht. In den Stadien HH 27 und 29 reduziert sich die Aktivität auf die Bereiche der Gelenke, des Perichondriums und der Fingerspitzen der Flügel (Pfeil) (weißer Stern markiert Spinalnerv und einwandernde Muskelzellen).

In den Abbildungen 18 e und f ist deutlich zu erkennen, dass die AChE - wie auch in den vorhergehenden Entwicklungsstadien - weiterhin stark in der AER und dem Ektoderm exprimiert ist. Dies verliert sich jedoch in den anschließenden Entwicklungsstadien (siehe Abbildung 18 f und g). Dass neben den chondrogenen Zellen auch der einwandernde



Spinalnerv und die Muskelzellen eine hohe Aktivität aufweisen, ist in dieser Färbung ebenfalls gut zu erkennen (siehe Abbildung 18 e-g, weißer Stern).

Betrachtet man die Fingerbereiche der späten Entwicklungsstadien in den angefertigten Frontalschnitten etwas genauer, so fällt auf, dass die AChE Aktivität besonders in den Bereichen des Perichondriums und den Gelenkbereichen zwischen den Fingerknochen lokalisiert ist (siehe Abbildung 19). Ab dem Stadium HH 29 sind die Metacarpalknorpel bereits deutlich vorhanden. An sie schließt sich eine AChE-aktive Kondensation für die Finger- und Zehenknochen an (Drews, 1972). Hierbei ist besonders auffällig, dass distal die gesamte Spitze der Flügelanlage noch bis zum Stadium HH 38 eine hohe Aktivität aufweist (siehe Abbildung 19, a und b, Pfeil).



**Abbildung 19: AChE Aktivität in den Gelenkregionen der Finger**

Dargestellt sind 12 µm dicke Frontalschnitte, die in antero-posteriorer Richtung vom Hühnerflügel angefertigt wurden. Die AChE Aktivität ist hierbei deutlich in den Gelenkbereichen (Pfeil), dem Perichondrium (Stern) und dem distalen Teil der Fingerspitzen von HH 34 und HH 38 alten Hühnern zu erkennen (Pfeil). Im Laufe der weiteren Entwicklung vermindert sich die AChE Aktivität in den Fingerspitzen. Im Perichondrium und den Gelenkbereichen ist sie jedoch noch bis zum Stadium HH 41 lokalisiert. Die Abbildungen (d) und (e) zeigen eine Detailaufnahme der Fingerknochen aus Abbildung (a) und (b). Hier ist deutlich die AChE Aktivität in der Interzone der Gelenkbereiche zu erkennen. Weitere Details siehe im Text.

Eine höhere Aufnahme der Gelenkbereiche der Flügelanlage lässt ein charakteristisches Bandenmuster der AChE Aktivität erkennen (siehe Abbildung 19 d). Die AChE ist während dieses Entwicklungsstadiums in den distalen Enden der Knorpelanlagen exprimiert (siehe Abbildung 19 d, weißer Pfeil). In diesen Bereichen bildet sich während der folgenden

---

Entwicklung der Gelenkspalt aus. Die AChE ist zusätzlich während dieser Phase besonders stark in der Interzone (siehe Abbildung 19 d, schwarzer Pfeil) des zukünftigen Gelenkbereiches exprimiert.

Neben der deutlichen Präsenz der AChE in den Orten der Skelettentwicklung zeigt sich auch ab HH 30 eine erhöhte Aktivität in den Zwischenfingerbereichen (siehe Abbildung 20), welche während der späteren Entwicklung der Gliedmaßen durch apoptotische Prozesse vollständig reduziert werden.



**Abbildung 20: AChE-Aktivität in den Zwischenfingerbereichen der Hinterextremität**

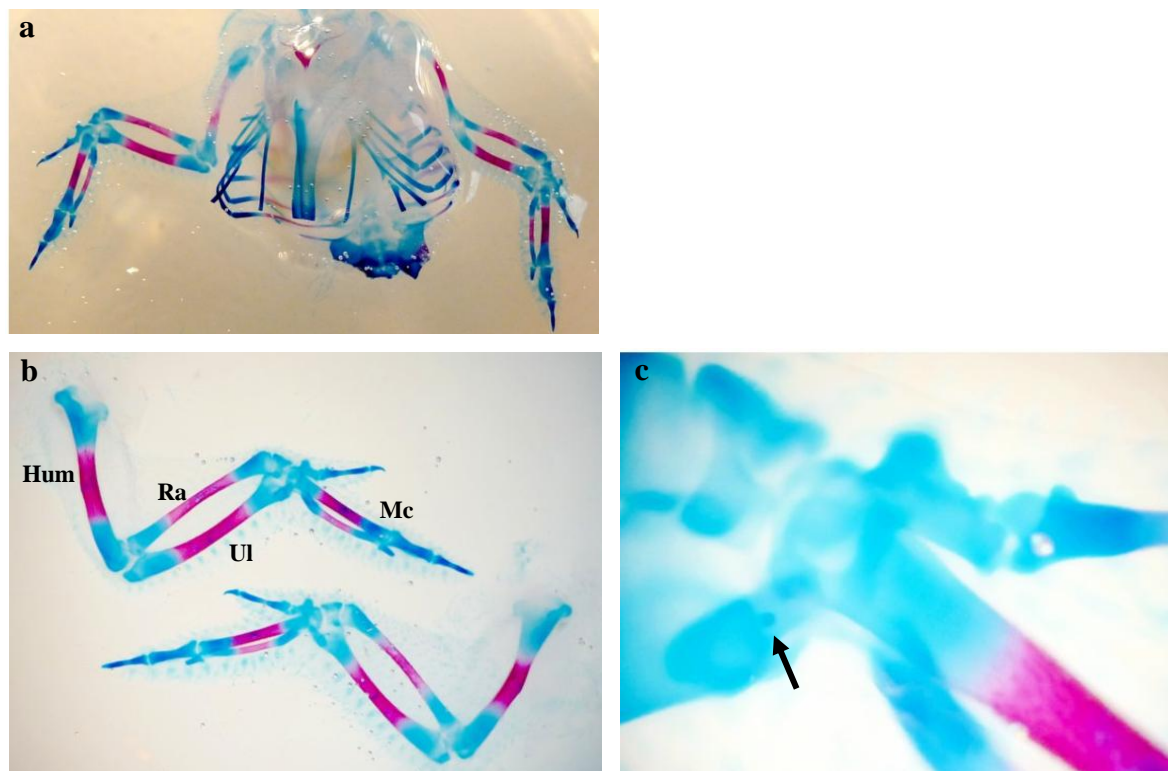
Die Abbildung zeigt Frontalschnitte der Hinterextremität von Hühnerembryonen der Stadien HH 30-34. In den dargestellten Entwicklungsstadien ist die AChE Aktivität besonders stark in den Zwischenfingerbereichen der hinteren Hühnerextremität lokalisiert.

Zusammenfassend kann anhand der angefertigten Aktivitätsstudie gesagt werden, dass die AChE Aktivität in den Bereichen der sich entwickelnden Skelettstrukturen lokalisiert ist und während der gesamten Determination der Extremitätenknochen in diesem Bereich erhalten bleibt. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Stadien zeigt sich, dass die AChE während der frühen Extremitätenentwicklung (HH 20-23) besonders stark im Ektoderm, der AER und dem ventralen Mesenchym der Flügelanlage lokalisiert ist. Während der weiteren Entwicklung verlagert sich die Aktivität im Mesenchym langsam nach zentral. Ab dem Entwicklungsstadium HH 25 geht die Aktivität im Bereich der AER verloren, während sie in den Bereichen des kondensierenden Knorpels des Humerus immer noch sehr aktiv ist. In den späteren Entwicklungsstadien (HH 28-38) beschränkt sich die AChE Aktivität auf die Bereiche des Perichondriums, den Gelenkbereichen und der distalen Spitze der Flügelanlage. Parallel dazu nimmt die Aktivität im Zentrum der Knorpelanlage langsam ab. In den späten Entwicklungsstadien (HH 30-34) erscheint sie dann zusätzlich in den Zwischenfingerbereichen der Hühnerextremität, in denen durch apoptotische Prozesse die Bildung der Fingerglieder stattfindet.

### 3.1.2 Manipulation der Hühnerextremität mit PBS-Beads

Aus der vorangegangenen Aktivitätsstudie ergibt sich die Frage, welche Rolle die AChE in der Knochenentwicklung spielt. Um die Funktion der Cholinesterase während der Skelettentwicklung besser verstehen zu können, werden in den folgenden Abschnitten unterschiedliche *in vivo* Experimente zur Klärung dieser Frage durchgeführt.

Um eine sichere Aussage über den Einfluss der AChE-Inhibitoren auf die Skelettentwicklung treffen zu können, wird in einem Vorversuch überprüft, ob durch die bei der Bead-Manipulation erzeugten Verletzungen Veränderungen in der späteren Extremitäten- bzw. Skelettentwicklung hervorgerufen werden. Hierzu werden die Agarosebeads anstelle des Inhibitors in 1x PBS getränkt und im Stadium HH 17/18 anterior in die frühe Extremitätenknospe implantiert. Zum Zeitpunkt der Fixierung befinden sich die manipulierten Hühnerembryonen im Stadium HH 37/38.



**Abbildung 21: Knorpel-Knochen Färbung eines mit 1x PBS behandelten Hühnerembryos**

Dargestellt ist die Färbung der Skelettelemente der vorderen Hühnerextremität mit Hilfe der Alcianblau-Alizarinrot Kombinationsfärbung. Die Implantation des 1x PBS Beads erfolgte im Stadium HH 17. Der Embryo wurde im Stadium HH 38 fixiert und anschließend die Knorpelmatrix mit Alcianblau und die mineralisierte Knochenmatrix mit Alizarinrot angefärbt. In (a) ist die ventrale Ansicht des Oberkörpers gezeigt. Der rechte Flügel wurde mit PBS behandelt. In (b) sind die beiden Vorderextremitäten in einer Dorsalansicht gegenübergestellt. Der direkte Vergleich der mit 1x PBS behandelten Extremität (oben) mit der unbehandelten kontralateralen Extremität (unten) zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Ausbildung der Knorpelmatrix oder der Mineralisierung der Knochenmatrix. Der Pfeil in (c) markiert die Position des implantierten Agarosebeads im Handbeugeknochen. (Hum: Humerus, Ra: Radius, Ul: Ulna, Mc: Metacarpale)



---

In Abbildung 21 a ist exemplarisch der Oberkörper eines mit PBS manipulierten Hühnerembryos nach einer kombinierten Knorpel-Knochenfärbung dargestellt. Der Knochenschaft zeigt bereits die für dieses Stadium typische Ausbildung der Knochenmatrix (rot), während die Knochenköpfe noch über die Knorpelmatrix verfügen (blau). Die Vergrößerung der behandelten Extremität (siehe Abbildung 21 c) zeigt den implantierten Bead in der Region der Handbeugeknochen (Ulnare). Die Gegenüberstellung der manipulierten und der kontralateralen unbehandelten Extremität zeigt keinen Unterschied in der Ausbildung der Knorpelmatrix bzw. der Mineralisierung der Knochenmatrix (siehe Abbildung 21 b). Auch die Vermessung der Skelettelemente zeigt im Vergleich zur kontralateralen Extremität keine signifikanten Größenunterschiede in der Knochenanzahl, Knochenlänge oder Knochendicke (Daten nicht gezeigt). Dieser Vorversuch wurde insgesamt an 3 Hühnerembryonen durchgeführt, wobei es in keinem einzigen Fall zu einer morphologischen oder phänotypischen Veränderung der Morphologie oder Matrixentwicklung der Skelettstrukturen in den Hühnerextremitäten gekommen ist.

---

### **3.1.3 Manipulation der Hühnerextremität mit BW284c51 und MAB 304**

---

Nachdem durch den Vorversuch sichergestellt ist, dass es bei der angewendeten Implantationsmethode zu keinen Artefakten in der Extremitäten- und Skelettentwicklung kommt, wird in den folgenden Versuchen die Rolle der AChE in der embryonalen Skelettentwicklung durch die Verwendung des BW284c51-Inhibitors und dem AChE-Antikörper MAB 304 untersucht. BW284c51 ist ein „dualbindender“ Inhibitor, der sowohl an der PAS als auch der CAS der AChE bindet und damit sowohl die enzymatische Aktivität als die Funktion der AChE als Adhäsionsmolekül hemmt. Der AChE-Inhibitor MAB 304 bindet dagegen nur an die PAS des Enzyms, die enzymatische Aktivität bleibt hierbei unbeeinflusst (siehe Einleitung S. 5).

Die für die erste Implantationsreihe zu verwendenden Agarosebeads werden in einer  $10^{-2}$ M Stammlösung des BW284c51 Inhibitors präinkubiert und im Stadium HH 17 anterior in die vordere Hühnerextremität implantiert (siehe Methoden S. 36). Im Verlauf dieser Versuchsreihe wurde auch ein manipulierter Hühnerembryonen 24 Stunden nach der Manipulation fixiert, um die Inhibition der enzymatischen AChE-Aktivität durch den Inhibitor verfolgen zu können.

---

Abbildung 22 zeigt diesen Hühnerembryo im Stadium HH 21. Der Pfeil in der Abbildung markiert die Position des implantierten Beads. Es ist deutlich zu erkennen, dass dieser Bead nach der Implantation nicht anterior verblieben ist, sondern erst zentral im proximalen Bereich der Flügelanlage zum Erliegen kam.



**Abbildung 22: AChE-Inhibition durch BW284c51-getränkten Bead**

Die Abbildung zeigt die Dorsalansicht eines Hühnerembryos (HH 21) 24 Stunden nach der Beadimplantation mit dem BW-Inhibitor. Die AChE Aktivität wird mit Hilfe der Karnovsky-Roths Färbemethode als Braunfärbung dargestellt. Der implantierte Bead ist deutlich proximal in der rechten vorderen Extremität zu erkennen. Der direkte Vergleich mit der unbehandelten kontralateralen Extremität zeigt eine Inhibition der AChE Aktivität in der behandelten Extremität.

Der direkte Vergleich der BW284c51-behandelten Extremität mit der unbehandelten kontralateralen Extremität zeigt eine deutliche Inhibition der AChE Aktivität in der gesamten behandelten Extremitätenknospe. Die Inhibition durch BW284c51 ist jedoch ausschließlich auf die Extremitätenknospe beschränkt und beeinflusst die AChE Aktivität des angrenzenden Neuralrohrs und der Somiten nicht, wobei die auftretende Inhibition jedoch transient ist und sich in späteren Stadien nicht mehr nachweisen lässt (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 23 a ist exemplarisch ein mit BW284c51 manipulierter Hühnerembryo im Stadium HH 37 nach einer kombinierten Knorpel-Knochenfärbung dargestellt. In einer vergrößerten Aufnahme der behandelten Extremität des Embryos lässt sich die Position des implantierten Beads noch genau bestimmen (siehe Abbildung 23 e). Obwohl während der Implantation der Beads darauf geachtet wird, dass die Beads möglichst immer in der gleichen Region gesetzt werden, kommt es vor, dass die Beads unterschiedlich fest im Gewebe eingebunden werden und damit unterschiedlich weit in der auswachsenden Extremität mit wandern. So konnten die Beads im Verlauf dieser Versuchsreihe nach der Fixierung der manipulierten Embryonen entweder im distalen Bereich des Humerus, in der Nähe von Radius und Ulna (siehe Abbildung 23 e), oder im proximalen Bereich des Humerus lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt). Trotz der unterschiedlichen Lage der BW284c51-Beads kommt es jedoch bei allen auswertbaren Manipulationen zu einem Verlust der Mineralisierung der Skelettelemente.

---

Abhängig von der Lage der Embryonen im Ei werden in den meisten Manipulationen die Beads in die rechte Vorderextremität der Hühnerembryonen implantiert (siehe Abbildung 23 b). In Abbildung 23 a ist ein manipulierter Embryo dargestellt, der sich im Ei gedreht hat und mit der linken Körperhälfte zur Eiöffnung geschaut hat. Aus diesem Grund ist in dieser Manipulation die linke Hühnerextremität behandelt worden.

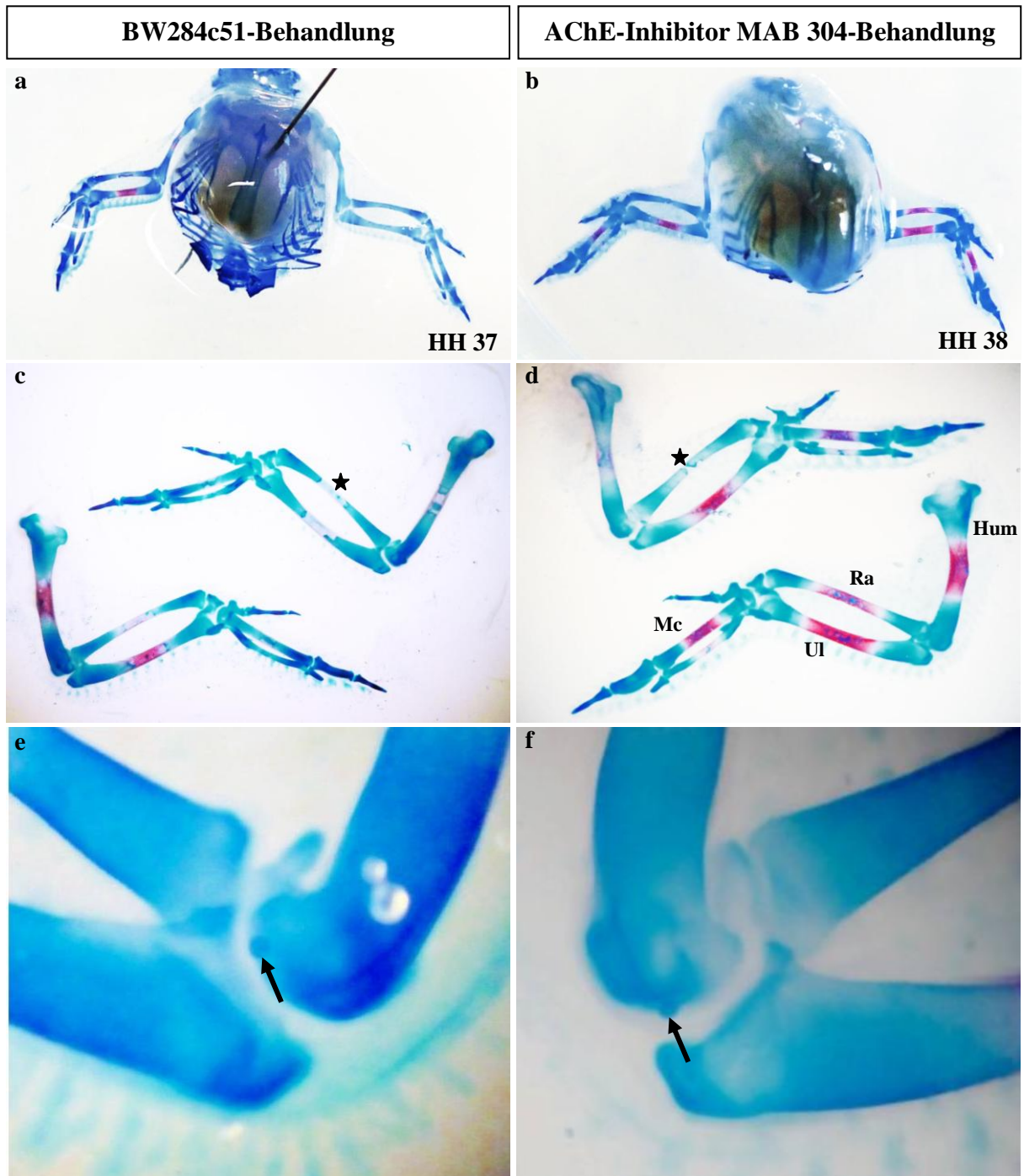
Der direkte Vergleich der behandelten Extremität mit der unbehandelten Extremität zeigt, dass es in der unbehandelten kontralateralen Extremität zu einer für dieses Stadium typischen Ausbildung der Knochenmatrix (rot) im Knochenschaft von Humerus und Ulna gekommen ist. Dem gegenüber stehen der Knochenschaft von Radius und Metacarpale, die zwar schon einen Abbau der Knorpelmatrix im Ossifikationszentrum zeigen, eine mineralisierte Knochenmatrix jedoch noch nicht aufgebaut haben.

In der behandelten Extremität zeigt sich dagegen in keinem Extremitätenknochen eine einsetzende Mineralisierung der primären Ossifikationszentren, obwohl der Knorpelabbau in diesen Bereichen unbeeinflusst zu sein scheint (siehe Abbildung 23 c). Bei der weiteren Untersuchung und der Vermessung der Skelettelemente zeigt sich im Vergleich zur kontralateralen unbehandelten Extremität in keinem Experiment eine signifikante Veränderung in der Knochenanzahl, der Knochenlänge oder der Knochendicke (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Behandlung mit BW284c51 gezeigt hat, dass die Inhibition der enzymatischen Aktivität von AChE zu einem Verlust der Verknöcherung in der späteren Skelettentwicklung führt, wird in einem darauf aufbauenden Versuch untersucht, ob diese Funktion von der enzymatischen Aktivität abhängt oder in einer anderen Funktion der AChE wie zum Beispiel seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül begründet ist (siehe Einleitung S. 3). Um dies zu untersuchen wird ein AChE-spezifischer Antikörper verwendet, der an die PAS der AChE bindet, die enzymatische Aktivität jedoch unbeeinflusst lässt (Fambrough et al., 1982; Sharma und Bigbee, 1998).

Für die Manipulation werden Agarosebeads, die zuvor in dem aufgereinigten monoklonalen AChE-Antikörper Mab 304 präinkubiert wurden, in die vordere Extremität von HH 18 alten Hühnerembryonen implantiert (siehe Methoden S. 36).

Die Embryonen befinden sich zum Zeitpunkt der Fixierung im Stadium HH 38. In Abbildung 23 b ist ein mit MAB 304-Antikörper behandelter Hühnerembryo in einer Übersichtsfärbung dargestellt.



**Abbildung 23: Knorpel-Knochen-Färbung eines mit BW284c51 und MAB 304 behandelten Hühnerembryos**

Dargestellt ist die Färbung der Skelettelemente der vorderen Hühnerextremität mit Hilfe der Alcianblau-Alizarinrot Kombinationsfärbung. In der linken Abbildung (a, c und e) ist exemplarisch ein Embryo, dem im Stadium HH 17 ein BW284c51-Bead implantiert wurde, dargestellt. Die Fixierung erfolgte im Stadium HH 37. Der in der rechten Abbildung (b, d und f) dargestellte Embryo wurde zu HH 18 mit MAB 304 behandelte und im Stadium HH 38 fixiert. Die Pfeile in (e) und (f) markieren die jeweilige Position des implantierten Beads im distalen Bereich des Humerus. (a) und (b) zeigen die Ventralansicht des gesamten Oberkörpers der manipulierten Embryonen. (c) und (d) zeigen eine Gegenüberstellung der behandelten (oben) und unbehandelten (unten) Extremität in einer Dorsalansicht. Die BW-Behandlung zeigt einen vollständigen Verlust der Ossifikation in allen Skelettelementen der behandelten Extremität. Der MAB 304 Antikörper weist dagegen nur eine fehlende Mineralisierung in Humerus und Radius auf. Die posterior gelegenen Skelettstrukturen bleiben unbeeinflusst. Darüber hinaus zeigt sich jedoch ein fehlender Abbau der Knorpelmatrix in Humerus und Radius (Stern), der in der BW-Behandlung nicht auftritt. (Hum: Humerus, Ra: Radius, Ul: Ulna, Mc: Metacarpale)

---

Die Detailaufnahme der behandelten Extremität zeigt, dass der implantierte Bead - wie auch in der BW284c51-Behandlung (siehe Abbildung 23 e) - im distalen Bereich des Humerus, direkt im Gelenkspalt positioniert ist (siehe Abbildung 23 f). Diese gleiche Positionierung der Beads in den beiden Manipulationen erlaubt es die Effekte des BW284c51-Inhibitors direkt mit den Auswirkungen des MAB 304-Antikörpers auf die Skelettentwicklung zu vergleichen.

Der direkte Vergleich der beiden unterschiedlich manipulierten Embryonen zeigt, dass der MAB 304-behandelte Embryo zu einem etwas späteren Entwicklungszeitpunkt fixiert wurde (siehe Abbildung 23 a und b). Der in Abbildung 23 d dargestellte Embryo, weist in der unbehandelten kontralateralen Extremität (rechte Extremität) bereits eine vorangeschrittene Mineralisierung der primären Ossifikationszentren von Humerus, Radius und Ulna und Teilen der Metacarpale auf. Der Effekt auf die Mineralisierung der Skelettelemente ist jedoch im Vergleich zur BW284c51-Behandlung deutlich schwächer ausgeprägt. Während es in der BW-Behandlung zu einem vollständigen Verlust der Mineralisierungsprozesse in den behandelten Extremitäten kommt, zeigen die Skelettelemente der MAB 304-Behandlung lediglich eine fehlende Ossifikationsprozesse in Humerus und Radius (siehe Abbildung 23 b und d). Die von der Manipulationsstelle ausgehend posterior gelegenen Skelettelemente scheinen von der AChE-Inhibition nicht betroffen zu sein. Anders als in der BW-Behandlung zeigt sich beim Einsatz von MAB 304 jedoch auch ein Effekt auf die Knorpeldifferenzierung. Durch den Einsatz des MAB 304-Antikörpers kommt es zu einem gestörten Abbau der Knorpelmatrix im primären Ossifikationszentrum von Humerus und Radius. Der direkte Vergleich mit der BW-behandelten Extremität macht diesen Effekt noch deutlicher (siehe Abbildung 23 c und d, Stern). Die weitere Untersuchung und Vermessung der Skelettelemente zeigt jedoch, wie auch im vorhergehenden Versuch, keine signifikanten Veränderungen in der Knochenlänge oder der Knochendicke (Daten nicht gezeigt).

Für die Untersuchung der Funktion der AChE während der frühen Skelettentwicklung sind für die BW284c51-Manipulationsreihe insgesamt 10 Hühnerembryonen im Stadium HH 17 manipuliert worden. Davon sind in den folgenden Inkubationstagen 2 Embryonen (entspricht 20%) an den Folgen der Manipulation gestorben. Bei dieser Manipulationsmethode kann es zudem während der weiteren Inkubation der manipulierten Embryonen vorkommen, dass der Bead auch nachträglich noch aus der Extremität herausfällt. Aus diesem Grund werden die manipulierten Embryonen in den ersten 48 Stunden täglich auf die Anwesenheit und Lage der Beads hin untersucht und Embryonen mit herausgefallenen Beads aus der Versuchsreihe

entfernt. Dies machte in dieser Versuchsreihe weitere 4 Embryonen aus (siehe Tabelle 1). Die Untersuchung der verbliebenen 4 Embryonen zeigt, dass es in allen Behandlungen zu einem vollständigen Verlust der Ossifikation in den Skelettelementen kommt, während die Knorpeldifferenzierung keine phänotypischen Veränderungen aufweist.

**Tabelle 1: Statistische Auswertung der durch BW284c51 und MAB 304 erzielten Defekte in der Skelettentwicklung**

Die Anzahl der manipulierten Embryonen ist als Stückzahl und in Prozenten angegeben. Während der Kultivierung gestorbene Embryonen oder Embryonen bei denen es während der weiteren Kultivierung zu einem Verlust des implantierten Beads gekommen ist, werden aussortiert.

	<b>BW284c51 (HH 17-37) n=10</b>		<b>MAB 304 (HH 18-38) n=5</b>		<b>MAB 304 (HH 22-38) n=5</b>	
	<b>mit Effekt</b>	<b>aussortiert</b>	<b>mit Effekt</b>	<b>aussortiert</b>	<b>mit Effekt</b>	<b>aussortiert</b>
<b>Anzahl</b>	4	6	4	1	0	2
<b>Effekt in %</b>	40	60	80	20	0	40

Für die Untersuchung des Einflusses des MAB 304 Antikörpers wurden insgesamt 5 Hühnerembryonen im Stadium HH 18 manipuliert. Aus dieser Versuchsreihe ist lediglich ein Embryo an den Folgen der Manipulation gestorben. Die Auswertung der restlichen Embryonen zeigt, dass es wie bei der Inhibition mit BW284c51, zu einer verminderten Mineralisierung der Skelettelemente kommt. Die Ausprägung des Effektes variiert jedoch zwischen den einzelnen Individuen stark. So zeigen 2 Embryonen einen vollständigen Verlust der Mineralisierung der Skelettelemente (Daten nicht gezeigt), während die anderen 2 lediglich in den anterior gelegenen Skelettelementen einen Ossifikationsverlust ausweisen (siehe Abbildung 23 d). Anders als in den BW-Behandlungen zeigt sich jedoch in diesen Embryonen auch ein Defekt in der Knorpeldifferenzierung. Aufgrund der Inhibition der PAS der AChE kommt es in den primären Ossifikationszentren der betroffenen Skelettelemente nicht nur zum Verlust der Ossifikation, sondern auch zu einer Inhibition im Abbau der Knorpelmatrix (vergleiche Abbildung 23 c und d, Stern).

Die durchgeführte Aktivitätsstudie der AChE zeigt, dass sich während der Entwicklung der Hühnerembryonen von HH 20-HH 22 die AChE Aktivität von ventral nach zentral verlagert. Aus diesem Grund wurden in der Manipulationsreihe auch spätere Stadien mit dem

---

MAB 304-Antikörper behandelt. Für diese Versuchsreihe wurden 5 Hühnerembryonen im Stadium HH 22 mit MAB 304 behandelt (siehe Tabelle 1). Davon sind 2 Embryonen nach der Manipulation gestorben. Die Auswertung der restlichen Hühnerembryonen zeigte keine Auswirkung der AChE-Inhibition auf die Mineralisierung der Knochenmatrix oder den Abbau der Knorpelmatrix (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die transiente Inhibition der AChE mit BW284c51 oder MAB304 *in ovo* zu einem Verlust der Mineralisierung der Skelettelemente in den Hühnerembryonen führt. Durch die Verwendung dieser beiden unterschiedlichen Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Ossifikation von der enzymatischen Aktivität des Enzyms unabhängig zu sein scheint, da diese bei beiden Inhibitoren beobachtet werden konnte. Allerdings zeigt sich bei der Verwendung des MAB 304 Antikörpers, anders als bei BW284c51, eine zusätzliche Inhibition des Knorpelabbaus im primären Ossifikationszentrum.

Neben der Lage des implantierten Beads (anterior vs. zentral) scheint auch der Zeitpunkt der Inhibition (vergleiche Implantation von MAB 304 zu HH 18 und HH 22, Tabelle 1) von besonderer Bedeutung zu sein. Findet die Inhibition durch MAB 304 erst zu HH 22 statt, können die zu HH 18 beobachteten Defekte in der Matrixmineralisierung oder dem Knorpelabbau in den Extremitätenknochen nicht mehr beobachtet werden.

---

## 3.2 Phänotypische Charakterisierung der Cholinesterase-Knockout-Mäuse

---

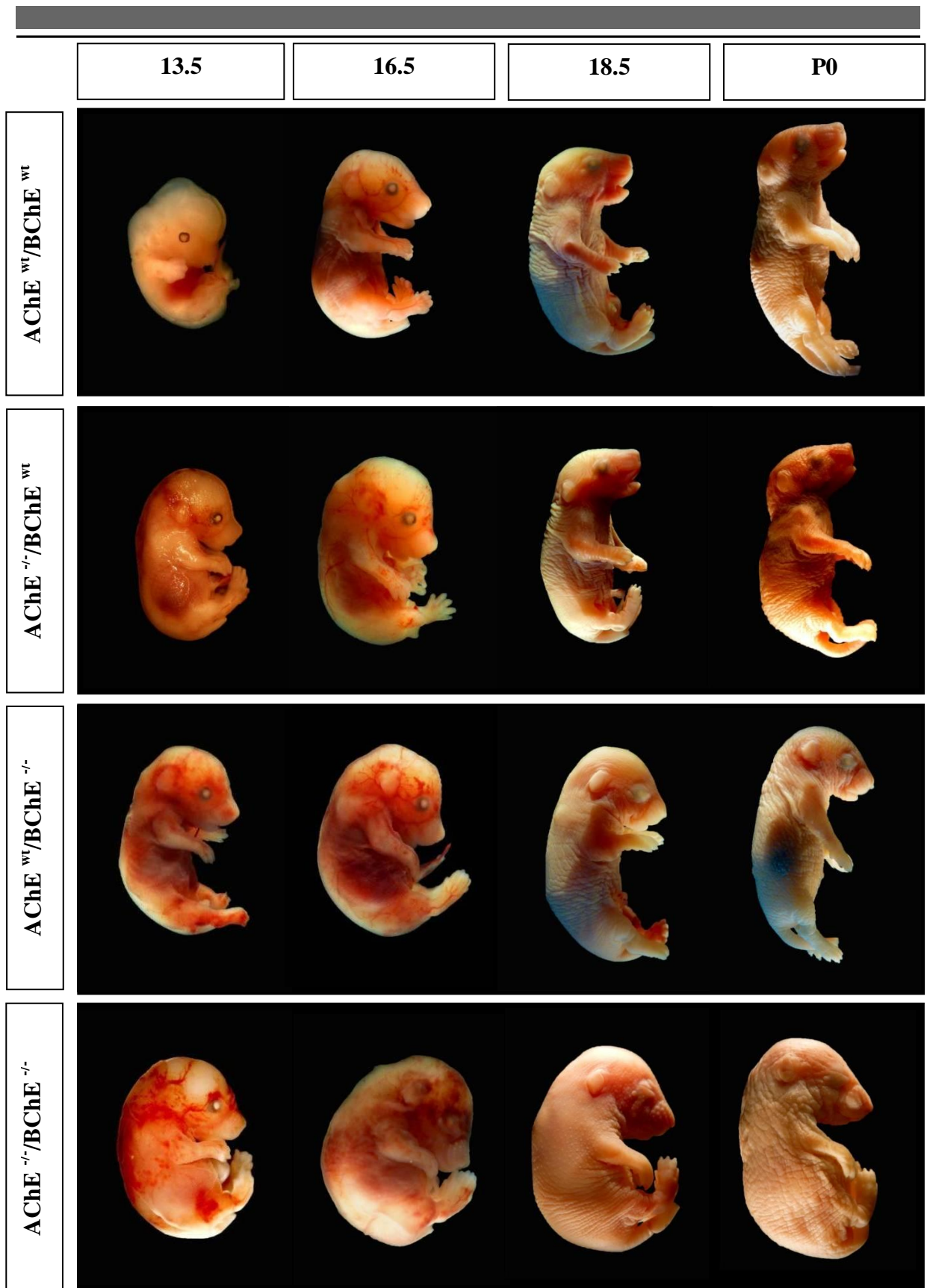
In Ergänzung zu den Manipulationsversuchen im Huhn wurde zusätzlich untersucht, welchen Einfluss die Cholinesterasen auf die embryonale Skelettentwicklung haben, wenn sie im Modellorganismus permanent ausgeknockt sind.

Für die folgenden Untersuchungen werden die Phänotypen dreier genetisch veränderter Mauslinien ( $AChE^{-/-}/BChE^{+/+}$ ,  $AChE^{+/+}/BChE^{-/-}$ ,  $AChE^{-/-}/BChE^{-/-}$ ) miteinander verglichen. In einer ersten Gegenüberstellung der unterschiedlichen Genotypen zeigt sich an Embryonaltag 13.5 (E13.5) ein besonders ausgeprägter Phänotyp. Vergleicht man zu E13.5 die Wildtypmaus mit den Cholinesterase-Einzelknockouts und der Doppel-Knockout-Mutante, so fällt am stärksten der deutliche Größenunterschied zwischen den Mausmutanten und der Wildtypmaus auf (siehe Abbildung 24). Trägt man die Geburtsgewichte der verschiedenen Mauslinien an den Entwicklungstagen 13.5 bis P0 gegeneinander auf, so sieht man zu E13.5, dass die Wildtypmaus im Vergleich zu den Mausmutanten ein deutlich geringeres Geburtsgewicht (siehe Abbildung 25) aufweist. Vergleicht man die direkten Gewichte miteinander, so sind die Mausmutanten im Durchschnitt 3,8 mal schwerer als die vergleichbare Wildtypmaus.

Diese Größen- und auch der Gewichtsunterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mausmutanten relativieren sich jedoch ab E16.5 und nähern sich bis E18.5 schnell an die Werte der Wildtypmaus an (siehe Abbildung 25). Betrachtet man neben dem offensichtlichen Größenunterschied den Phänotyp der unterschiedlichen Mauslinien zu E13.5 etwas genauer, so fällt auf, dass die Mausmutanten entsprechend ihrer morphologischen Charakteristika in ein höheres Entwicklungsstadium eingestuft werden müssten. Dieses entspräche nach der phänotypischen Einstufung von Theiler dem Entwicklungsstadium E14.5 in Wildtypmäusen (Theiler, 1989). Es hat demnach den Anschein als würde die Abwesenheit von Cholinesterasen während der frühen embryonalen Entwicklung die Entwicklung des Organismus in den ersten Tagen stark beschleunigen (siehe Abbildung 24 und 25).

In der Doppel-Knockout-Mutante ist zu E13.5 zudem eine deutliche Deformation der Rumpfregeion, ein stark vergrößerter Kopf und ein erheblich vergrößerter Bauchbereich zu erkennen. Außerdem sind die Extremitäten im Vergleich zu den anderen Mauslinien viel stärker abgewinkelt (siehe Abbildung 24,  $AChE^{-/-}/BChE^{-/-}$ , E13.5). Diese Veränderungen bleiben in der Doppel-Knockout-Mutante bis zu P0 erhalten (siehe Abbildung 24,  $AChE^{-/-}/BChE^{-/-}$ , P0).

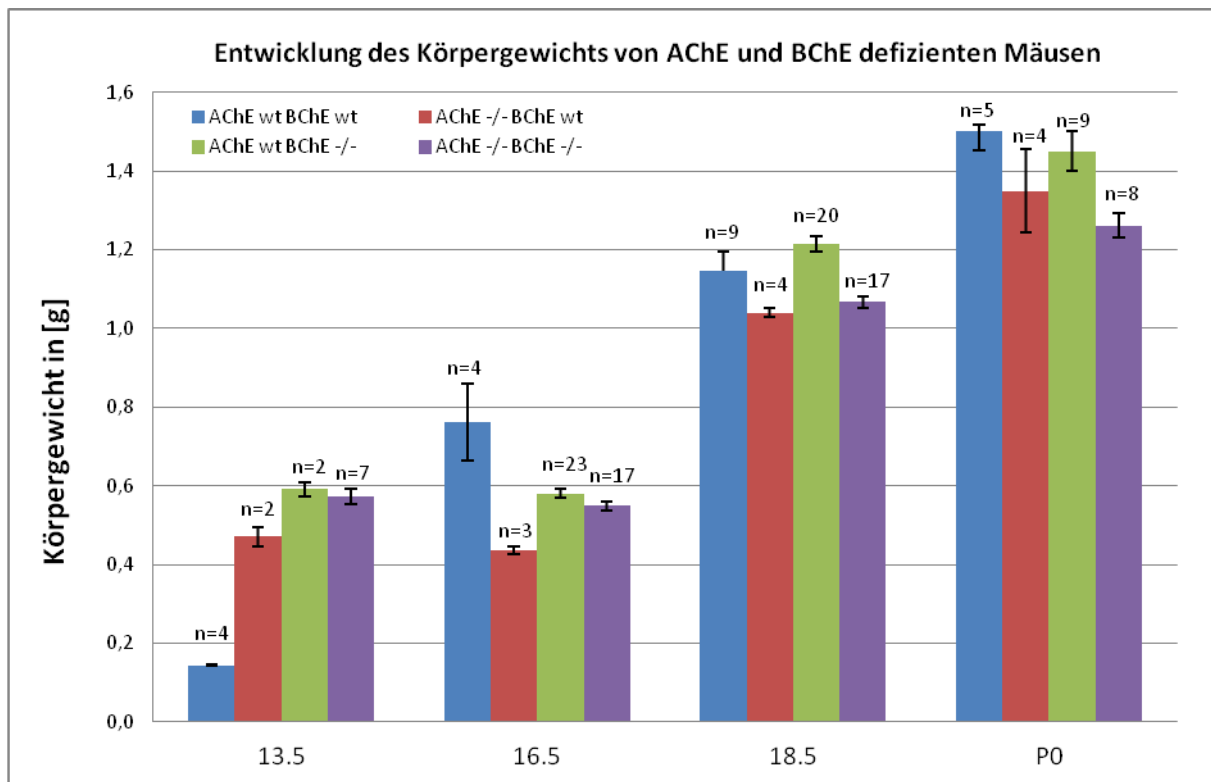




**Abbildung 24: Übersicht über den Phänotyp der Cholinesterase Knockout Mäuse**

In der Übersicht sind die Wholemount Aufnahmen der unterschiedlichen Cholinesterase-Genotypen zu verschiedenen Embryonaltagen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Cholinesterase-Mutanten im Vergleich zur Wildtypmaus einen enormen Entwicklungsschub aufweisen. Weitere Details siehe Text.

Vergleicht man die Mausmutanten am Entwicklungstag E16.5 mit der Wildtypmaus, so fällt bei allen Mutanten auf, dass sie in ihrer Größe kaum zunehmen, während die Wildtypmaus einen deutlichen Wachstumsschub aufweist. Dies lässt sich auch anhand der Darstellung der Geburtsgewichte gut erkennen. Während die Mausmutanten kaum einen Gewichtsunterschied zum vorhergehenden Entwicklungsstadium aufzeigen, nimmt das Geburtsgewicht der Wildtypmaus um das 5,3fache zu (siehe Abbildung 25). In beiden Cholinesterase-Einzelknockouts zeigt sich zu E16.5 eine leichte Verkrümmung der Rumpffregion. Dabei erscheint die Kopf-Rumpf-Region im Vergleich zur Wildtypmaus weniger stark gestreckt, was dazu führt, dass der Kopf auf der Brust aufliegt (siehe Abbildung 24,  $AChE^{-/-}BChE^{wt}$ ,  $AChE^{wt}BChE^{-/-}$ , E16.5). In der Doppel-Knockout-Mutante ist dieser Phänotyp am ausgeprägtesten zu erkennen (siehe Abbildung 24,  $AChE^{-/-}BChE^{-/-}$ , E16.5).



**Abbildung 25: Darstellung der Gewichtszunahme während der Embryonalentwicklung der Mutanten**

Das ermittelte Körpergewicht der unterschiedlichen Cholinesterase-Genotypen der Maus wird in Gramm (g) angegeben. Pro Messpunkt ist die Anzahl der untersuchten Individuen mit (n) angegeben. Das Embryonalgewicht der Mäuse wird zu den Entwicklungszeitpunkten E13.5, E16.5 E18.5 und zur Geburt (P0) miteinander verglichen. Es ist gut zu erkennen, dass die Cholinesterase-Knockout-Mäuse zum Embryonalstadium E13.5 deutlich schwerer sind als die vergleichbare Wildtypmaus. Dieser Effekt relativiert sich jedoch mit fortschreitender Entwicklung. So ist zu P0 kein signifikanter Unterschied in den Geburtsgewichten der beiden Einzel-Knockout Mäuse mehr zu erkennen. Lediglich die Cholinesterase-Doppel-Knockout Mutante zeigt ein deutlich geringeres Geburtsgewicht als die vergleichbaren Wildtypmäuse.

---

In den folgenden Entwicklungstagen relativieren sich die phänotypischen Unterschiede, das Gewicht und die Größe zwischen den verschiedenen Mauslinien. So ist die AChE-Knockout-Maus zu E18.5 und P0 phänotypisch kaum noch von der Wildtypmaus zu unterscheiden (siehe Abbildung 24, Wildtyp, AChE<sup>-/-</sup>/BChE<sup>wt</sup>, E18.5 und P0). Auch die BChE-Knockout-Maus weist an E18.5 nur sehr geringe phänotypische Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf. Hier zeigt sich, dass die Augen und die Linse weniger deutlich hervortreten als im Wildtyp oder der AChE-Knockout-Maus (siehe Abbildung 24, AChE<sup>wt</sup>/BChE<sup>-/-</sup>, E18.5 und P0). Das gleiche Phänomen tritt in der Doppel-Knockout-Maus noch um einiges stärker auf. Es hat den Anschein, als wäre die Epidermis zu E18.5 und P0 so stark verdickt, dass das Pigmentepithel und die Linse nicht mehr durch das Gewebe hindurchscheinen können. Im Vergleich zu den anderen Mauslinien unterscheidet sich die Cholinesterase Doppel-Knockout-Maus an P0 besonders durch ihren vergrößerten Kopf, ihre stark vergrößerte Bauchregion und ihre angewinkelten Gliedmaßen (siehe Abbildung 24, AChE<sup>-/-</sup>/BChE<sup>-/-</sup>, E18.5 und P0).

---

### **3.2.1 Einfluss des Cholinesterase-Knockouts auf die Skelettentwicklung in der Maus**

---

Um die Rolle der Cholinesterasen während der Skelettentwicklung genauer untersuchen zu können, werden die verwendeten Mauslinien zuerst auf ihre Knorpel- und Knochenentwicklung hin untersucht (siehe Abbildung 26 bis 32). In den folgenden Abschnitten soll dabei im Einzelnen auf die Beobachtungen im Bereich des Brustkorbs, der Wirbelsäule und des Schwanzbereiches eingegangen werden. Anschließend werden die Auswirkungen des Cholinesterase-Knockouts näher anhand der Extremitäten der verschiedenen Mauslinien beschrieben.

---

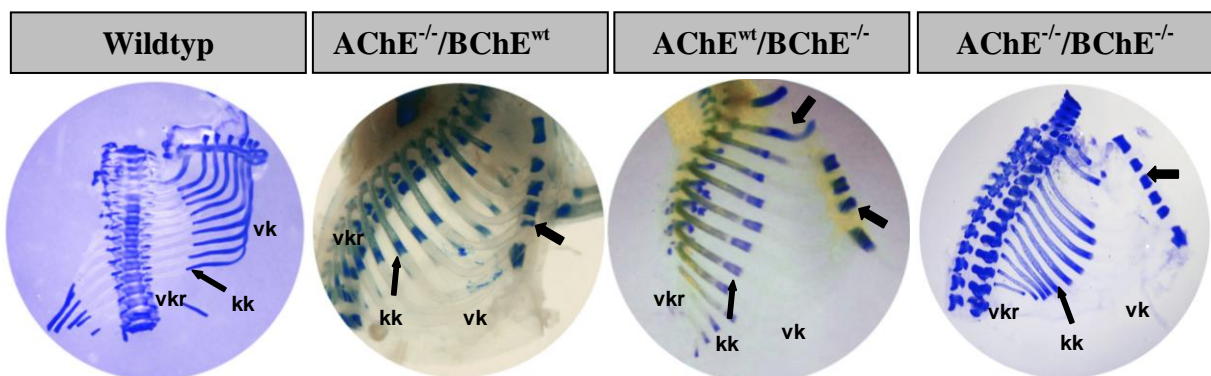
#### **3.2.1.1 Graduelle Proteoglykandegradation im Brustkorb**

---

Für die folgenden Untersuchungen wurden die verschiedenen Skelettelemente, die mit Hilfe der endochondralen Ossifikation gebildet werden, in unterschiedliche Gruppen (Rippenknochen und Wirbelknochen) aufgeteilt.

In Abbildung 26 sind die Brustkörbe der drei verschiedenen Knockout-Mäuse im Vergleich zur Wildtypmaus in einer Knorpelfärbung direkt gegenübergestellt. In der Wildtypmaus sind die drei Zonen der Rippenknochen deutlich zu erkennen. Von der Wirbelsäule ausgehend

unterscheidet man zuerst die verknöcherte Rippenzone (vkr), die sich in der Knorpelfärbung als ungefärbter Bereich darstellt. Daran schließt sich direkt die Knorpel-Knochen-Zone an (kk). Der blau gefärbte Bereich ist der Teil des Rippenbogens, der noch aus Knorpel (vk) besteht. Dieser grenzt an das Brustbein, welches oben rechts im Bild zu erkennen ist (siehe Abbildung 26, Wildtyp).



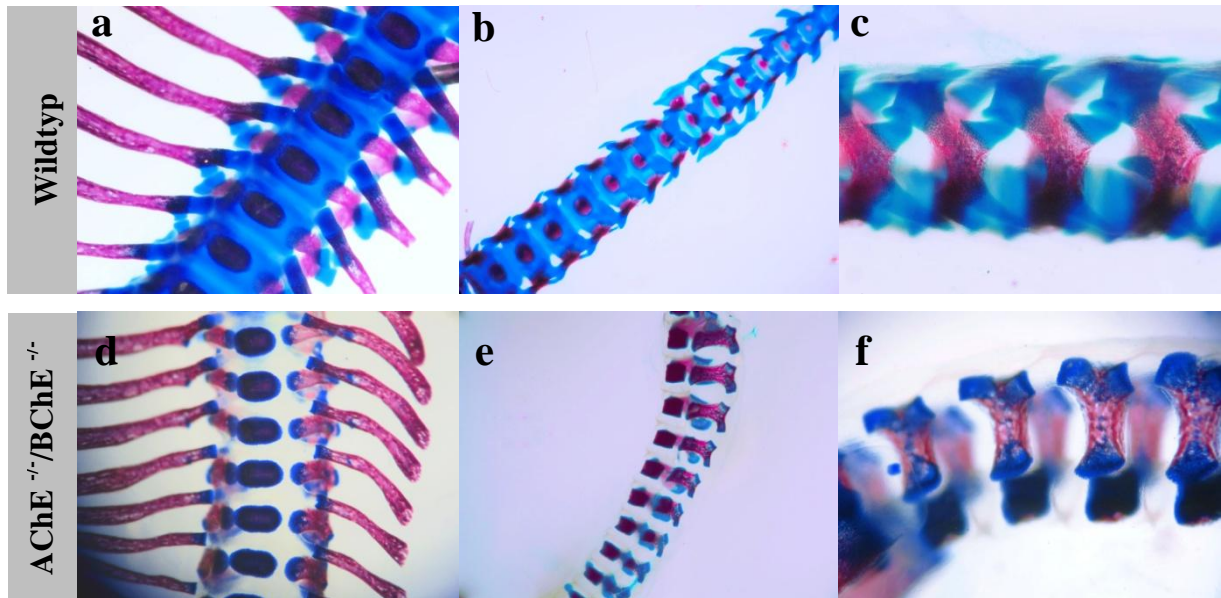
**Abbildung 26: Veränderter Knorpelmatrixabbau im Brustkorb der verschiedenen Maus-Mutanten zu P0**

In der Abbildung sind die Proteoglykane (PG) und Glykosamine (GAG) der Knorpelmatrix mit Alcianblau gefärbt. Dargestellt ist die Ansicht des rechten Brustkorbs der Wildtypmaus und der verschiedenen Cholinesterasemutanten (P0). Die Färbung der Knorpelmatrix zeigt, dass der Brustkorb der AChE- und BChE-Einzel-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtypmaus einen starken Abbau der Knorpelmatrix aufweist. Hier findet sich nur in einzelnen Bereichen des Brustbeins und in der Knorpel-Knochen-Zone des Rippenbogens eine nachweisbare Knorpelfärbung (Pfeil). Die Cholinesterase Doppel-Knockout-Maus zeigt sowohl einen Verlust der Knorpelmatrix im verknorpelten Bereich des Rippenbogens, als auch in zusätzliche Färbung der verknöcherten Rippenzone des Rippenbogens (Pfeil). verknöcherte Rippenzone: vkr; Knorpel-Knochen-Zone: kk; verknorpelte Rippenzone: vk

Betrachtet man die Knorpelfärbung der AChE- und BChE-Knockout-Maus näher, so ist deutlich der ungefärbte Bereich sowohl in der verknorpelten (vk) als auch der verknöcherten Rippenzone (vkr) zu erkennen. Lediglich in der Knorpel-Knochengrenze (kk) der Rippenknochen und im Knochenschaft der Brustbeinknochen ist ein kleiner Bereich mit Knorpelmatrix anfärbbar. In der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus zeigt sich dagegen, anders als bei den anderen beiden Mausmutanten, noch eine zusätzliche Blaufärbung in der verknöcherten Rippenzone (siehe Abbildung 26). Hier fehlt demnach die natürliche Degradation der Knorpelmatrix, was zu einem inversen Erscheinungsbild der Knorpelfärbung führt. Färbt man in der Doppel-Knockout-Maus auch die mineralisierte Knochenmatrix an, so zeigt sich, dass der verknöcherte Bereich keine veränderte Mineralisierung aufweist (Daten nicht gezeigt).

Verfolgt man den Abbau der Knorpelmatrix in den Cholinesterase-Mutanten genauer, so fällt auf, dass diese Degradation nicht gleichmäßig erfolgt. Es hat vielmehr den Anschein als würde der Matrixabbau von caudal nach cranial einem noch unbekannten Gradienten folgen.

So kann man bei der AChE-Knockout-Maus an P0 noch eine deutliche Blaufärbung der Rippenknochen im cranialen Bereich erkennen, während die Knorpelbereiche der Rippenbögen im caudalen Bereich bereits keine Blaufärbung mehr aufweisen (siehe Abbildung 26 AChE<sup>wt</sup>/BChE<sup>-/-</sup>, dicker Pfeil).



**Abbildung 27: Detailaufnahme der Wirbelknochen zeigt defekten Knorpelabbau in der Doppelmutante**

In der Abbildung sind die Doppelfärbungen der Wirbel- und Schwanzknochen der Wildtypmaus und Cholinesterase Doppel-Knockout-Maus zu P0 im Vergleich zueinander dargestellt. Die Proteoglykane (PG) und Glykosamine (GAG) der Knorpelmatrix werden mit Alcianblau gefärbt. Die Calciumionen der Knochenmatrix werden mit Alizarinrot nachgewiesen. Die Doppelfärbung zeigt in den Dornfortsätzen und den Wirbelkörpern der Wirbelknochen einen deutlichen Verlust der Knorpelmatrix (fehlende Blaufärbung in d, e und f). (a-c) ventrale Ansicht der Rippenbögen und Wirbelkörper (a), der Schwanzknochen (b) und die linke Ansicht der Schwanzknochen im Detail (c) der Wildtypmaus. (d-f) ventrale Ansicht der Rippenbögen und Wirbelkörper (d), der Schwanzknochen (e) und die linke Ansicht der Schwanzknochen (f) der Cholinesterase Doppel-Knockout-Maus im Detail.

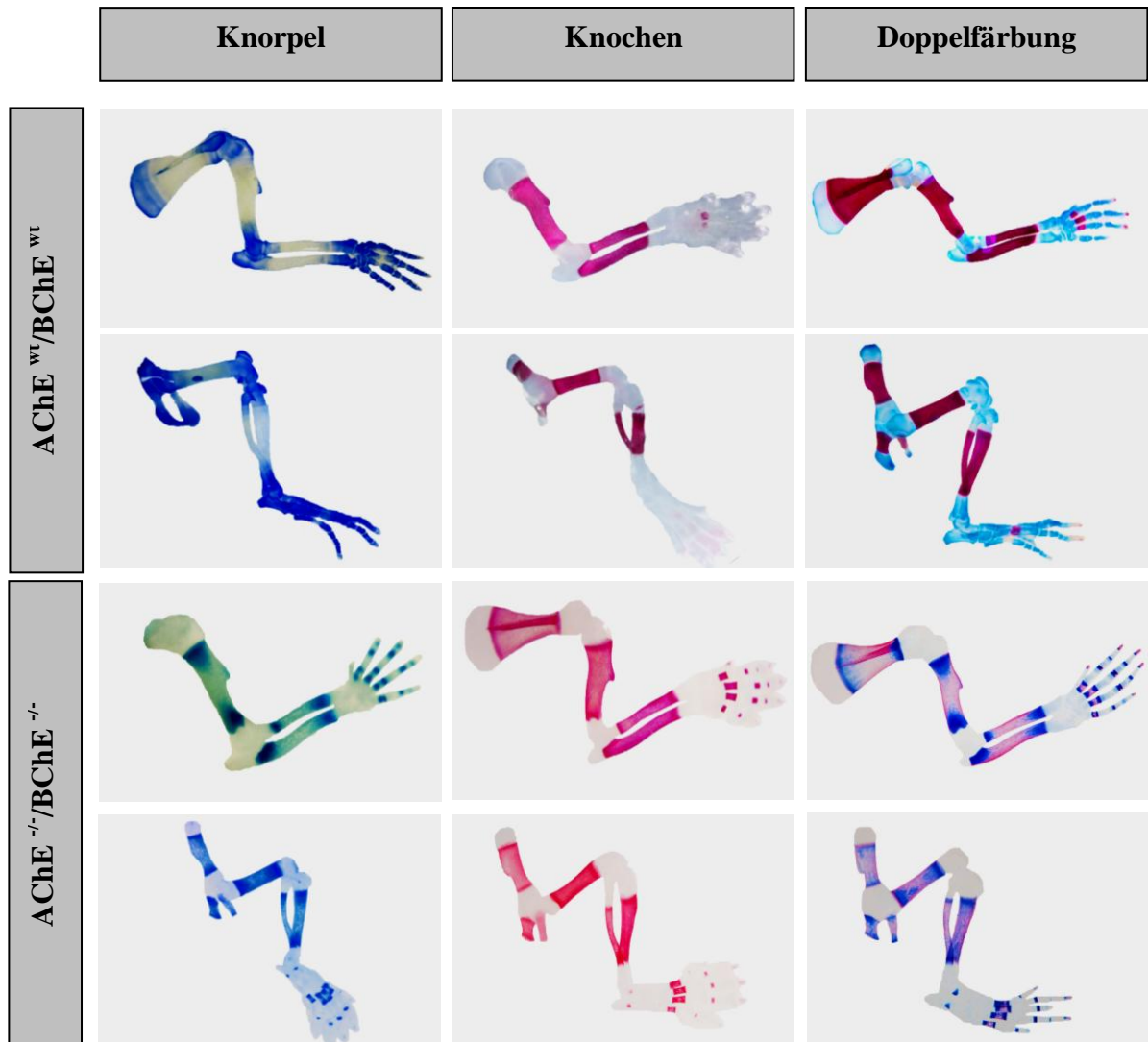
Die bereits beschriebene Knorpeldegradation setzt sich in den Knorpelbereichen der Wirbelknochen des Mausschwanzes fort, während auch hier die Knorpelmatrix in den Knochenbereichen der Doppel-Knockoutmaus erhalten bleibt. Führt man in einem solchen Fall eine Doppelfärbung der Knorpel- und Knochenmatrix durch, so stellt sich dieses Gewebe durch die Überlagerung der unabgebauten Knorpel- und der mineralisierten Knochenmatrix in diesen Bereichen durch eine typische Lilafärbung dar (siehe Abbildung 27 d-f).

### 3.2.1.2 Einzelfärbung der Extremitätenknochen der Cholinesterase Knockout Mäuse

Im folgenden Abschnitt soll die Degradation der Knorpelmatrix an den Extremitäten der unterschiedlichen Mauslinien zu P0 genauer betrachtet werden. Hierfür werden die Vorder-



und Hinterextremitäten in den Knorpel- und Knochen-Einzelfärbungen mit der Kombinationsfärbung verglichen (siehe Abbildung 28 und 29).

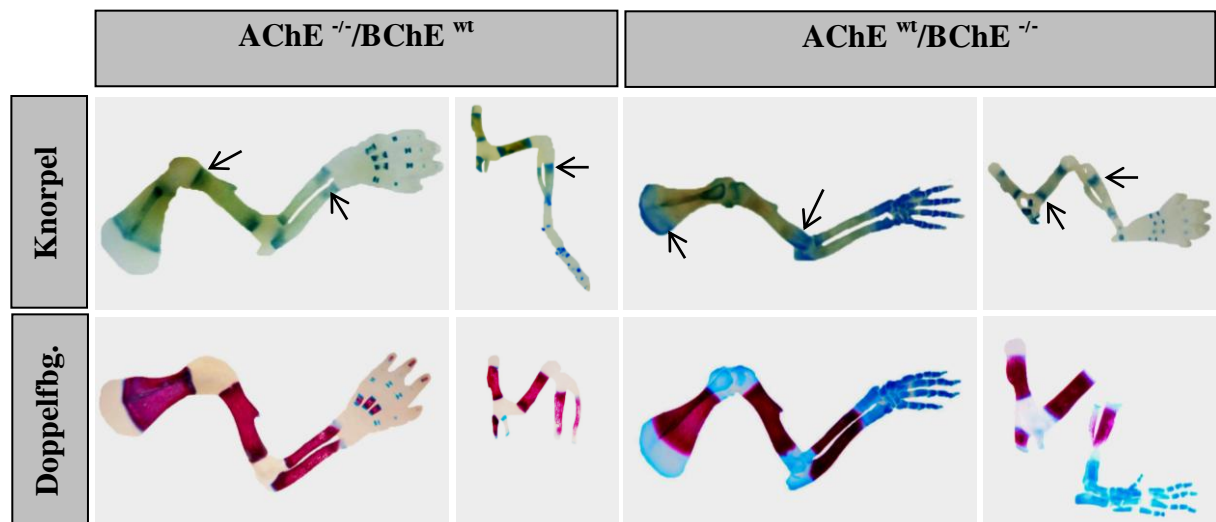


**Abbildung 28: Knorpel-Einzelfärbung zeigt Degradation der Knorpelmatrix in der Cholinesterase Doppel-Knockout-Maus**

In der Abbildung sind die Einzelfärbungen der Knorpel- und Knochenmatrices sowie die Doppelfärbung der Extremitätenknochen der Wildtypmaus und Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus zu P0 im Vergleich dargestellt. Die Knorpel-Einzelfärbung zeigt in der Doppel-Knockout-Maus eine deutliche Degradation der Knorpelmatrix. Im Gegensatz zum Wildtyp können in der Mutante keine PGs und GAGs in den Knochenköpfen der verschiedenen Knochen mehr nachgewiesen werden. Es finden sich jedoch atypische Anhäufungen von PGs und GAGs im Knochenschaft der Doppel-Knockout-Maus. Im Wildtyp werden die Proteoglykane der Knorpelmatrix in diesem Bereich parallel zur Mineralisierung der Knochenmatrix durch eine Vielzahl enzymatischer Prozesse abgebaut. Obwohl der Proteoglykanabbau im Knochenschaft der Doppelmutante gestört ist, lässt sich keine Anomalie in der Mineralisierung der Knochenmatrix in der Mutante nachweisen (siehe Knochen-Einzelfärbung). Pro Färbung der Wildtypmaus wurde ein anderes Individuum gefärbt. Bei der Doppelmutante stammen die Knorpel- und die Knochenfärbungen von einem Individuum. Für die Knochenfärbung wurde eine weitere Doppelmutante herangezogen.

In Abbildung 28 sind die Extremitäten der Wildtypmaus und der Cholinesterase Doppel-Knockout-Maus direkt gegenübergestellt. Hierbei ist die Degradation der Knorpelmatrix in

der Mausmutante deutlich zu erkennen. Die im Wildtyp gefärbten Knorpelbereiche in den Knochenköpfen und den Fingerknochen bleiben in der Doppelmutante ungefärbt, während der Knochenschaft, in dem zu diesem Entwicklungszeitpunkt die Knorpelmatrix bereits durch enzymatische Prozesse abgebaut sein sollte, eine deutliche Knorpelfärbung aufweist (siehe Abbildung 28, Knorpelfärbung von AChE<sup>-/-</sup>/BChE<sup>-/-</sup>). Die Knochenfärbung der Doppel-Knockout-Maus zeigt dagegen im Vergleich zur Wildtypmaus keine histologisch erkennbaren Unterschiede in der Färbung (siehe Abbildung 28, Knochenfärbung von AChE<sup>-/-</sup>/BChE<sup>-/-</sup>). Durch die veränderte Lokalisation der Knorpelmatrix erscheint der Knochenschaft der Mausmutante in der Doppelfärbung lila und nicht rot, wie es bei der Wildtypmaus der Fall ist (siehe Abbildung 28, Doppelfärbung).



**Abbildung 29: Knorpel-Einzelfärbung zeigt Degradation der Knorpelmatrix in den Cholinesterase Einzel-Knockout-Mäusen zu P0**

In der Abbildung sind die Einzelfärbungen der Knorpelmatrix sowie die Doppelfärbung der Extremitätenknochen der beiden Cholinesterase-Einzel-knockout Mäuse zu P0 im direkten Vergleich dargestellt. Die Proteoglykane (PG) und Glykosamine (GAG) der Knorpelmatrix sind mit Alcianblau gefärbt. Die Calciumionen der Knochenmatrix werden mit Alizarinrot nachgewiesen. Die Knorpel-Einzelfärbung zeigt in der Vorderextremität der BChE-Knockout Maus keinen auffälligen Phänotyp (siehe Pfeil) während in der Hinterextremität in proximo-distaler Richtung die Knorpelmatrix deutlich reduziert ist. Hier findet sich lediglich in kurzen Bereichen nahe der Wachstumsfuge (Zone der hypertrophen Chondrozyten, siehe Pfeil) eine nachweisbare Knorpelfärbung. Die AChE-Knockout Maus zeigt in der Knorpel-Einzelfärbung einen ähnlichen Phänotyp. Auch hier kommt es zu einer deutlichen Reduktion der PGs und GAGs der Knorpelmatrix. Beide Extremitäten sind jedoch im Vergleich zur BChE Mutante sehr viel stärker vom Knorpelabbau betroffen. Die Mineralisierung der Knochenmatrix ist in beiden Mutanten unverändert (siehe Knochen-Einzelfärbung). Die Färbung der AChE-Mutante stammt von einem Individuum, für die BChE-Mutante wurden für die jeweilige Färbungen unterschiedliche Individuen gefärbt.

Die Einzelfärbungen der AChE- und der BChE-Knockout-Maus zeigen einen ähnlichen Phänotyp. Während die Mineralisierung der Knochenmatrix in beiden Mausmutanten unverändert ist, zeigt sich bei der Knorpelmatrix eine deutliche Dislokalisierung der Blaufärbung. Die AChE-Knockout-Maus weist hierbei den höchsten Verlust an

---

Knorpelmatrix auf. Nur kleine Bereiche zwischen dem Knochenschaft und dem Knochenkopf sind blau gefärbt. Die Auswertung der dazu angefertigten Schnitte zeigt, dass es sich bei diesem Bereich um die Zone der terminalen hypertrophen Chondrozyten handelt (siehe Abbildung 32). Daher erscheint der Knochen dieser Mutante in der Doppelfärbung insgesamt in einem deutlich hellerem rot, die in den distalen Enden die Knorpelfärbung überdeckt (siehe Abbildung 29).

Die BChE-Knockoutmaus zeigt dagegen in der vorderen Extremität keine Veränderungen in der Färbung der Knorpel- oder Knochenmatrix. Lediglich in der Hinterextremität kommt es wieder zu einem erhöhten Verlust an Knorpelmatrix (siehe Abbildung 29). Die hier dargestellten Phänotypen sind jedoch in den einzelnen individuellen Knockout-Mäusen unterschiedlich stark ausgeprägt. Während einige BChE-Mutanten an P0 einen fast vollständigen Verlust der Knorpelmatrix aufweisen, zeigen andere Individuen noch verbleibende Knorpelfärbungen im Autopod (vergleiche Knorpel- und Doppelfärbung der Hinterextremität).

Obwohl der Defekt in den einzelnen Individuen unterschiedlich stark ausgeprägt ist, zeigen alle untersuchten Mausmutanten jedoch eine deutliche Degradation der Knorpelmatrix in den hinteren Extremitätenknochen. Hier kommt es ähnlich wie in der AChE-Knockout-Maus zu einem starken Abbau der Knorpelmatrix; nur kleine Bereiche zwischen dem Knochenschaft und dem Knochenkopf, die in histologischen Schnitten als Zone der terminalen hypertrophen Chondrozyten identifiziert wurden, zeigen noch eine deutliche Alcianblaufärbung (siehe Abbildung 29). Die Knorpeldefekte im Knochenschaft werden in ihrem Ausmaß nur in einer Knorpel-Einzelfärbung sichtbar, da sie in einer Kombinationsfärbung von der Knochenfärbung überdeckt werden.

---



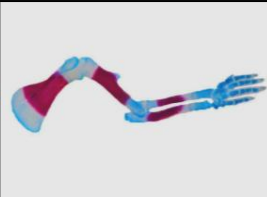
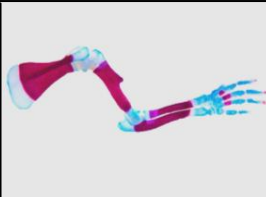




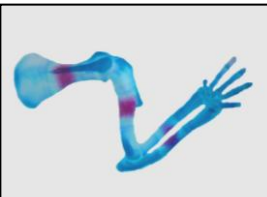

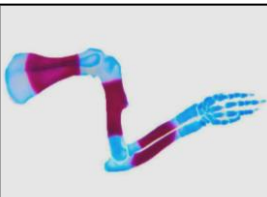
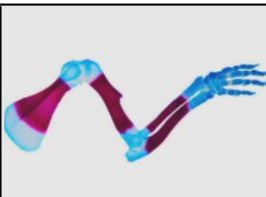
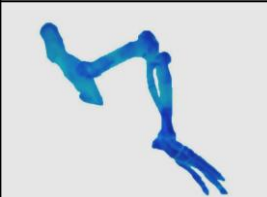


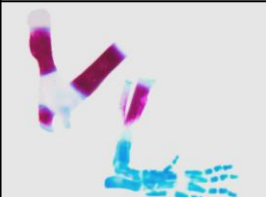
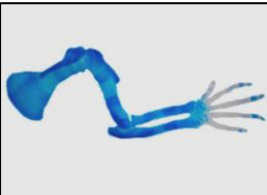



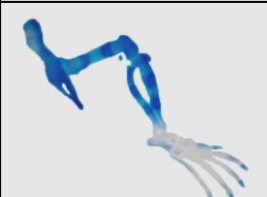
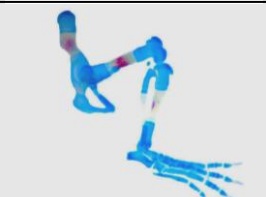


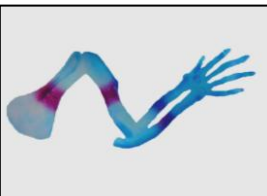
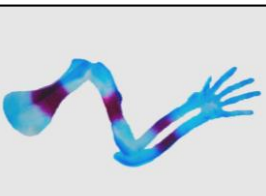
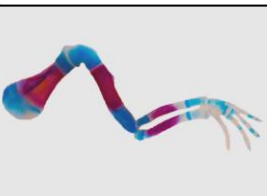

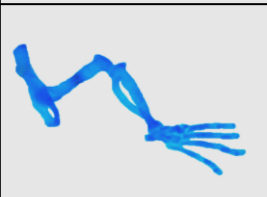
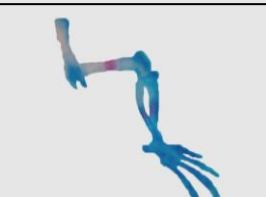
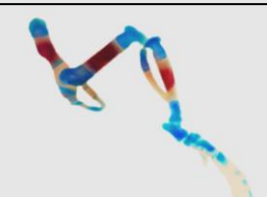
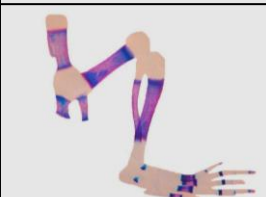
#### **3.2.1.3 Knorpeldegeneration in den Extremitätenknochen der Knockout-Mäuse während der embryonalen Skelettentwicklung**

---

Anhand einer Übersicht der Knorpel-Knochenstrukturen der Wildtypmaus und der Cholinesterase-Knockout-Mutanten soll die Ausbildung der Knorpeldefekte während der frühen Embryonalentwicklung von E13.5 bis P0 näher untersucht werden.

In Abbildung 30 sind die Vorder- und Hinterextremitäten der Wildtypmaus, der Cholinesterase Einzel-Knockout-Mäuse und der Doppel-Knockout-Maus in einer Knorpel-Knochen-Doppelfärbung dargestellt.



	13.5	16.5	18.5	P0
AChE <sup>wt</sup> /BChE <sup>wt</sup>				
				
AChE <sup>wt</sup> /BChE <sup>-/-</sup>				
				
AChE <sup>-/-</sup> /BChE <sup>wt</sup>				
				
AChE <sup>-/-</sup> /BChE <sup>-/-</sup>				
				

**Abbildung 30: Knorpel/Knochenfärbung der Extremitäten aller untersuchten Mutanten im Überblick**

Die Extremitätenknochen unterschiedlicher Entwicklungsstadien sind mit Alcianblau und Alizarinrot gefärbt. Weitere Details siehe Text.

---

Es ist deutlich zu erkennen, dass die dargestellten Vorder- und Hinterextremitäten der unterschiedlichen Mausmutanten zu E13.5 einen ausgeprägten Größenunterschied im Vergleich zur Wildtypmaus aufweisen. Während sich in der Wildtypmaus gerade die Grundformen der Knochenelemente als Knorpelanlage abzeichnen, sind diese Strukturen in den Mausmutanten bereits in ihrer endgültigen Form festgelegt (siehe Abbildung 30, E13.5). Betrachtet man die Extremitäten an E13.5 näher, so fällt vor allem die früher einsetzende Mineralisierung der Vorderextremitäten in der BChE-Knockout- und der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus auf. Die AChE-Knockout-Maus unterscheidet sich von den anderen beiden Mausmutanten dahingehend, dass es zwar ebenfalls zu sehr viel weiter entwickelten Knorpelstrukturen, aber noch zu keiner Mineralisierung der Knochenelemente kommt (siehe Abbildung 30, E13.5 AChE-Mutante). Die Beobachtung, dass die Mineralisierung der vorderen Extremitätenknochen in der BChE- und Cholinesterase-Doppel-Mutante verfrüht einsetzt spricht für die Vermutung, dass es bei den beschriebenen Mausmutanten im Allgemeinen zu einer verfrühten Embryonalentwicklung kommt.

An Entwicklungstag E16.5 zeigen die Wildtypmaus und die Mausmutanten in Größe und Form gleich weit entwickelte Skelettelemente. Die Vorderextremität der Wildtypmaus zeigt bereits eine Mineralisierung der Scapula, Humerus, Radius und Ulna, während die Hinterextremität zwar schon das primäre Ossifikationszentrum andeutet, aber noch keine Mineralisierung aufweist. Die BChE-Knockout Maus-zeigt im Vergleich zu E13.5 kaum eine nennenswerte Veränderung der Skelettstrukturen. Weder in Form, Größe noch in der Ausprägung der Mineralisierung der Ossifikationszentren. Die AChE-Knockout-Maus dagegen zeigt eine deutliche Mineralisierung von Scapula, Humerus, Radius und Ulna. Im Gegensatz zur Wildtypmaus kommt es bei dieser Mutante ebenfalls zu einer beginnenden Mineralisierung des Pelvis, des Femur und der Tibia. Die Doppel-Knockout-Mutante zeigt, wie schon bei der BChE-Knockout beschrieben, kaum eine Veränderung in der Entwicklung der Vorderextremität im Vergleich zu E13.5. Die hintere Extremität hingegen ähnelt der hinteren Extremität der AChE-Knockout-Maus, in der ebenfalls eine bereits beginnende Mineralisierung des Pelvis und des Femur zu erkennen ist (siehe Abbildung 30, E16.5).

An Entwicklungstag E18.5 haben die Vorder- und Hinterextremität in der Wildtypmaus signifikant an Größe zugenommen und zeigen bis auf den Autopod eine deutliche Mineralisierung aller Extremitätenknochen. Die Vorderextremitäten der Mausmutanten lassen sich in diesem Entwicklungsstadium kaum von der Wildtypmaus unterscheiden. Auch hier

---

sind mit Ausnahme des Autopod alle Extremitätenknochen deutlich mineralisiert. Die Hinterextremitäten der AChE- und BChE-Knockout-Mäuse unterscheiden sich jedoch in ihrer Morphologie deutlich vom Wildtyp. Beide Mausmutanten zeigen einen großflächigen Verlust der Knorpelfärbung in den äußeren Knochenbereichen. Lediglich der Autopod und die Sitzbeinhöcker des Beckenknochens weisen eine unveränderte Knorpelfärbung auf. Wobei der Sitzbeinhöcker der BChE-Mutante im Vergleich zur AChE-Mutante und dem Wildtyp noch keine Ossifikation aufzeigen. Die Doppel-Knockout-Maus weist im Vergleich dazu nur in kleinen Bereichen der Skelettelemente eine verminderte Knorpelmatrix auf. Auch die Verknöcherung scheint in dieser Mausmutante nicht so deutlich ausgeprägt zu sein wie in den anderen beiden Mausmutanten und der Wildtypmaus (siehe Abbildung 30, E18.5).

Vergleicht man die verschiedenen Mausmutanten und die Wildtypmaus direkt nach der Geburt an P0 miteinander, so sind signifikante Unterschiede in den Phänotypen der Skelettelemente erkennbar. Wie bereits oben beschrieben zeigt die BChE-Knockout-Maus den geringsten Effekt in der Skelettentwicklung. In dieser Mutante kommt es nur in der hinteren Extremität zu einer phänotypischen Veränderung der Knorpelmatrix, während in den anderen beiden Mausmutanten beide Extremitäten gleich stark von den Knorpeldegradationen betroffen sind. Die BChE-Mutante unterscheidet sich in ihrem Phänotyp kaum vom Embryonaltag E18.5. Es ist lediglich ein Unterschied in der Extremitätengröße zu erkennen. Damit verbunden ist es auch zu einer Vergrößerung des mineralisierten Knochenschaftes gekommen. Zusätzlich zeigt sich in dieser Mutante ebenfalls eine beginnende Mineralisierung der dorsalen Region des Sitzbeinhockers (siehe Abbildung 30, BChE-Mutante zu P0). Die AChE-Mutante zeigt dagegen eine deutliche Veränderung im Vergleich zum Embryonaltag E18.5 auf. Im Gegensatz zum vorherigen Entwicklungsstadium sind zu P0 alle Knorpelstrukturen ungefärbt. Lediglich ein kleiner Bereich der Fingerknochen und der ventrale Bereich des Sitzbeinhockers weisen eine rudimentäre Knorpelfärbung auf. In beiden Extremitäten zeigt sich dagegen eine intensive Färbung der Knochelemente (siehe Abbildung 30, AChE-Mutante zu P0). Die Doppel-Knockout-Maus zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie die AChE-Mutante. Auch hier erscheinen alle Knorpelstrukturen ungefärbt, während in den Knochenbereichen der Skelettelemente eine Überlagerung der Knorpel- und Knochenfärbung durch eine Lilafärbung deutlich zu erkennen ist (siehe Abbildung 30, Doppel-Knockout-Maus zu P0).

---

#### **3.2.1.4 Einfluss des Cholinesterase-Knockouts auf die endochondrale Ossifikation**

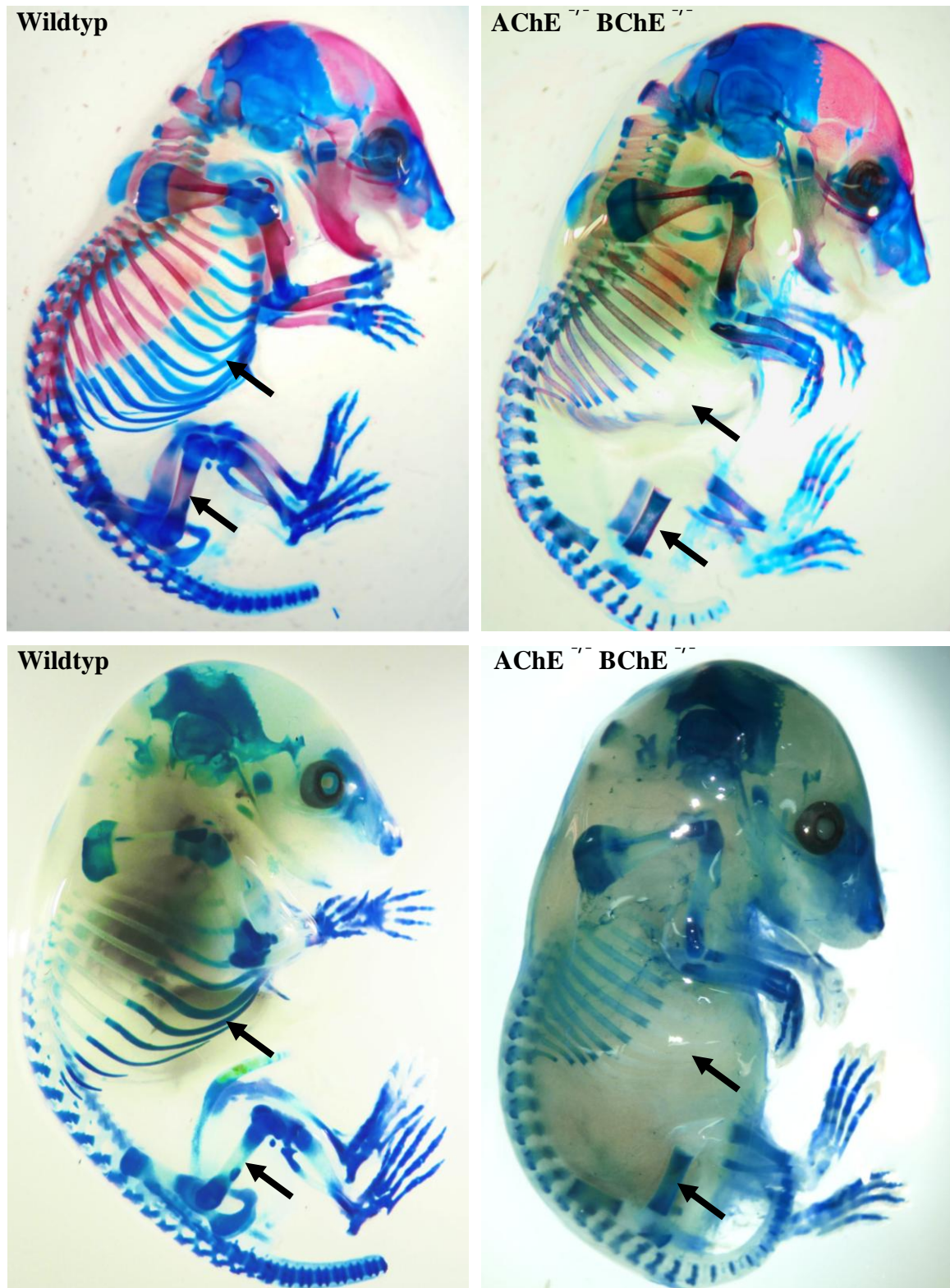
---

Anhand der vorangegangenen Abschnitte wird ersichtlich, dass sich die Degradation der Knorpelmatrix über eine Vielzahl unterschiedlicher Knochen erstreckt. Mit Hilfe des direkten Vergleichs von Wholemout-Färbungen des Wildtyps und der Doppel-Knockout-Maus sollen diese unterschiedlichen Effekte noch einmal zusammenfasst werden.

In Abbildung 31 sind die Wildtypmaus und die Doppel-Knockout-Maus zu P0 in einer Knorpel-Knochen-Doppelfärbung und in einer einfachen Knorpelfärbung dargestellt. Betrachtet man die Mäuse im direkten Vergleich, so fällt auf, dass es in der Kopfgregion keinen nennenswerten Unterschied zwischen den beiden Mauslinien gibt. Lediglich der Unterkiefer der Wildtypmaus scheint im Vergleich zur Cholinesterase Doppel-Knockout-Maus schon etwas weiter verknöchert zu sein (siehe Abbildung 31). Folgt man den Halswirbeln in caudaler Richtung, so sind auch in diesem Bereich keine Veränderungen in der Skelettbildung zu erkennen. Der Vergleich der Vorderextremitäten zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Desweiteren ist besonders auffällig, dass sich die Größe und Morphologie der Skelettknochen zwischen dem Wildtyp und der Cholinesterase Doppel-Knockout-Mutante nicht unterscheiden.

Der erste sehr deutliche Unterschied in der Lokalisation der Knorpel- und Knochenmatrices zeigt sich in den beiden Mäusen auf Höhe des Brustkorbes. Im Wildtyp verknorpeln und verknöchern die Rippenbögen von dorsal nach ventral. Daraus ergibt sich folgende Reihenfolge der Gewebe: von der Wirbelsäule ausgehend kommt zuerst die zu diesem Zeitpunkt bereits verknöcherte Rippenzone. Hieran schließt sich ein kleiner ungefärbter Bereich an, der die Knorpel-Knochen Grenze darstellt. Zum Brustbein hin besteht der Rippenbogen aus Knorpel.

Vergleicht man die Rippenbögen der Mäuse miteinander, so fällt in der Mausmutante auf, dass der Rippenbogen ausgehend von der Wirbelsäule verknöchert ist, die Rotfärbung jedoch deutlich schwächer als im Wildtyp ist. Die sich anschließende Knorpel-Knochen-Grenze tritt bei der Doppel-Knockout-Maus mit einer deutlichen Blaufärbung auf. Dies deutet darauf hin, dass es im Verlauf der endochondralen Ossifikation noch nicht zum Abbau der Knorpelmatrix gekommen ist. Der sich daran anschließende verknorpelte Rippenbogen zeigt im Vergleich dazu gar keine Blaufärbung mehr (siehe Abbildung 31, oberer Pfeil).



**Abbildung 31: Knorpel-/Knochenfärbung der Wildtyp- und Cholinesterase Doppel-Knockout Maus**

In der Abbildung sind die Wholemout-Färbungen der Knorpel- und Knochenelemente des Embryonalskeletts der Wildtypmaus (P0) und der Cholinesterase-Doppelknockout-Maus (P0) im Vergleich dargestellt. Die Knorpel-elemente sind mit Alcianblau, der Knochen mit Alizarinrot angefärbt. Sowohl in der Doppelfärbung als auch in der Knorpel-einzelfärbung ist die Dislokation der Knorpel-elemente im Knochenschaft und der Wirbelknochen zu erkennen. Darüber hinaus findet sich keine Knorpelfärbung mehr in den Knochenköpfen der Hinterextremität in den Rippen (Pfeil).

---

Vergleicht man anschließend die Wirbelsäulen der Mäuse miteinander, so wird ein ähnliches Erscheinungsbild der Knochenstruktur erkennbar. Während in der Wildtypmaus die Wirbelknochen eine deutliche Blaufärbung im Wirbelkörper und dem Dornfortsatz und eine Rotfärbung in den Querfortsätzen der Wirbelknochen aufweisen, bietet sich bei der Doppel-Knockout-Maus ein gänzlich anderes Bild. Hier erscheinen die Dornfortsätze und die Wirbelkörper wieder farblos, während es in den Querfortsätzen der Wirbelkörper zu einer Überlagerung einer sehr starken Blau- und einer etwas blasseren Rotfärbung kommt (siehe Abbildung 31). Das periphere Skelett zeigt ebenfalls einen deutlichen Phänotyp in der Mausmutante. Bereits im Becken anfangend fehlen die typischen Blaufärbungen der Knorpelstrukturen, während der Knochenschaft eine deutliche Überlagerung der Knorpel- und Knochenfärbung aufweist. Dieses Phänomen ist in einer Knorpel-Einfachfärbung noch deutlicher zu erkennen (siehe Abbildung 31, unten).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von der Degradation der Knorpelmatrix vor allem die Knochen betroffen sind, die durch den Prozess der endochondralen Ossifikation gebildet werden. Die Knorpelstrukturen im Kopfbereich, die über den Prozess der desmalen Ossifikation gebildet werden, zeigen keine phänotypischen Veränderungen (siehe Abbildung 31). Darüber hinaus scheinen die Knochen, die durch die endochondrale Ossifikation gebildet werden unterschiedlich stark von der Degradation betroffen zu sein. Während die Vorderextremitäten noch keine Degradation der Knorpelmatrix aufweisen, zeigt sich der Effekt deutlich in der Hinterextremität der Doppel-Knockout-Maus. Obwohl auch in der hinteren Extremität Unterschiede in der Ausprägung der Knorpeldegradation sichtbar werden. Während im proximalen Teil die Knorpelmatrix in den Diaphysen vollständig verschwunden ist, und nur noch im Knochenschaft nachgewiesen werden kann, zeigt sich im distalen Teil eine unveränderte Knorpelmatrix. Es scheint als würde die Knorpeldegradation sowohl einem caudal-cranialen und als auch einem proximo-distalen Gradienten folgen (siehe Abbildung 31).

---

### **3.3 Histochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten der Cholinesterase-Knockoutmäuse**

---

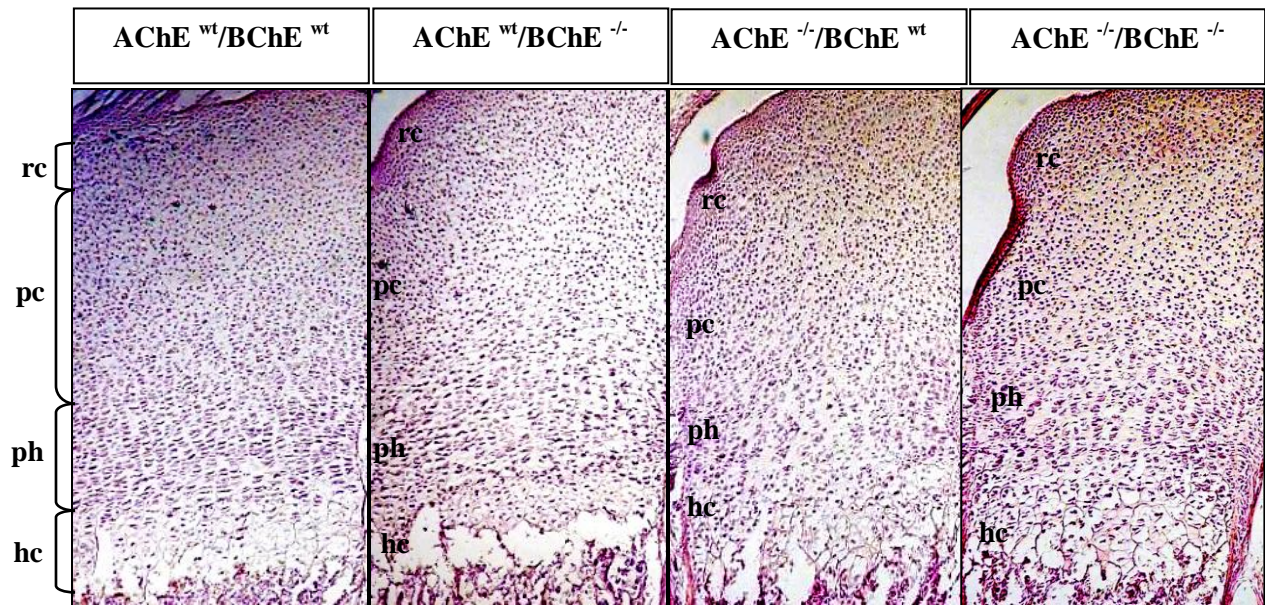
Um eine bessere Aussage über die an der Knorpeldegradation beteiligten Zelltypen treffen zu können, wurden anschließend an die Wholemout-Färbungen Gefrierschnitte der unterschiedlichen Cholinesterasemutanten zum Entwicklungszeitpunkt P0 angefertigt. An diesen Gefrierschnitten sind standardisierte histochemische Färbungen durchgeführt worden, um die bereits oben beschriebene Degradation der Proteoglykane in der Knorpelmatrix genauer charakterisieren und die davon betroffenen Zelltypen eindeutig spezifizieren zu können.

Zu diesem Zweck wird in einem ersten Schritt die Morphologie der Wachstumsfuge der Wildtypmaus und der unterschiedlichen Cholinesterasemutanten zu P0 näher untersucht. Mit Hilfe der Hämatoxylin/Eosin (HE)-Übersichtsfärbung kann die charakteristische Gliederung der Wachstumsfuge, die sich aufgrund der verschiedenen Differenzierungsstadien der Chondrozyten ergibt, dargestellt werden. In der oberen Zone des Knochenkopfes werden die ruhenden Chondrozyten (rc) als kleine runde, meist einzeln liegende Zellen nachgewiesen. Direkt daran schließen sich die proliferierenden Chondrozyten (pc) in der eigentlichen Wachstumszone des Knochens an. Die damit verbundene gesteigerte Produktion von ECM führt zu einem Auseinanderdrängen der Zellen in horizontaler Ebene und zur Ausbildung von Säulen aus abgeflachten Chondrozyten in longitudinaler Richtung. In der Übergangszone zum Knochen finden sich die prähypertrophen Chondrozyten (ph), die ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben. Anschließend folgen durch weitere Differenzierungen die hypertrophen Chondrozyten (hc), die den Übergang zum endochondralen Ossifikationsbereich der Diaphyse darstellen. Diese Zellen zeigen aufgrund ihres enormen Größenwachstums eine wabenartige Struktur der umliegenden Knorpelmatrix (siehe Abbildung 32).

In Abbildung 32 ist deutlich die bereits oben beschriebene charakteristische Gliederung der Wachstumsfuge der Wildtypmaus im Entwicklungsstadium P0 zu erkennen. Betrachtet man die HE-Färbung der BChE-Knockout-Maus näher, so fällt auf, dass die klare Unterscheidung der einzelnen morphologisch charakteristischen Differenzierungsstadien der Chondrozyten nicht mehr so deutlich ausfällt (siehe Abbildung 32). Der Bereich der prähypertrophen Chondrozyten zeigt eine weniger klare Säulenstruktur, als die vergleichbare Wildtypmaus. Viel deutlicher wird dieser Effekt jedoch in der AChE-Knockout-Maus. Hier ist die Gliederung stark gestört. Die Bereiche der proliferierenden und prähypertrophen



Chondrozyten sind nur schwer voneinander zu unterscheiden und gehen fließend ineinander über. Die charakteristische säulenartige Anordnung der prähypertrophen Chondrozyten lässt sich in dieser Mutante nicht mehr finden. Lediglich die hypertrophen Chondrozyten grenzen sich wegen ihrer charakteristischen wabenhaften Struktur der ECM deutlich von den anderen Differenzierungstypen ab (siehe Abbildung 32).



**Abbildung 32: Gliederung der Wachstumsfuge der Cholinesterasemutanten im Vergleich zum Wildtyp**

Dargestellt ist die Detailaufnahme der HE-Färbung im Entwicklungsstadium P0. Die Wildtypmaus zeigt eine charakteristische Gliederung der Wachstumsfuge. Bei der BChE-Knockout-Maus ist die säulenartige Struktur der prähypertrophen Chondrozyten nur schwer zu erkennen. In der AChE-Mutante können die prähypertrophen morphologisch kaum noch von den proliferierenden Chondrozyten unterschieden werden. Die Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus zeigt im Vergleich zu den anderen Mutanten die deutlichste Gliederung der Wachstumsfuge. Ruhende Chondrozyten (rc), proliferierende Chondrozyten (pc), prähypertrophe Chondrozyten (ph) und hypertrophe Chondrozyten (hc).

In der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus stellt sich die Wachstumsfuge wieder viel klarer strukturierter dar. Hier zeigt sich eine deutlichere säulenhafte Anordnung der prähypertrophen Chondrozyten, als in den anderen Cholinesterasemutanten. Die Zone der hypertrophen Chondrozyten scheint bei direktem Vergleich aller Mausmutanten im Vergleich zur Wildtypmaus die geringsten morphologischen Veränderungen aufzuweisen (siehe Abbildung 32).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Knockout der AChE zu einer deutlichen Desorganisation der Wachstumsfuge führt. Diese Desorganisation kann auch in der BChE-Mutante und der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus beobachtet werden, tritt dort aber in einem weniger starken Ausmaß auf.



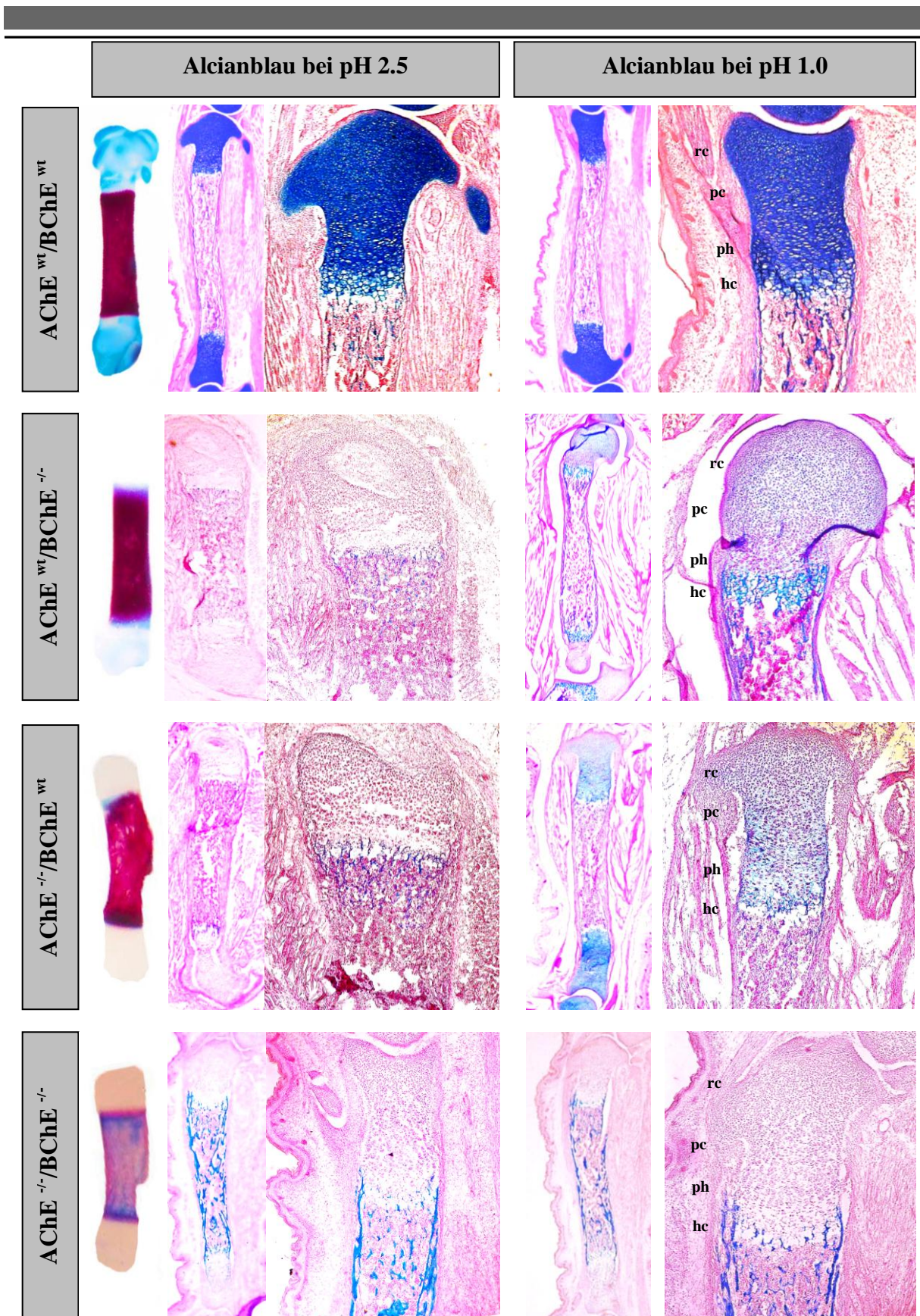
---

In Abbildung 33 sind Wholemout-Färbungen und 12 µm dicke Gefrierschnitte der unterschiedlichen Mausmutanten zu P0 dargestellt. Anhand der durchgeführten Alcianblaufärbungen bei unterschiedlichen pH-Werten können die sauren carboxylierten und schwach sulfatierten Proteoglykanen (PG) der ECM bei pH 2.5 und die stark sulfatierten Proteo- und Glykosaminoglykane (GAG) bei pH 1.0 unterschieden werden. Die stark sulfatierten PGs stellen einen überwiegenden Anteil der Knorpelmatrix dar und werden während der endochondralen Ossifikation erst nach den sauren carboxylierten und schwach sulfatierten Mucosubstanzen enzymatisch abgebaut. Anhand dieses später einsetzenden Abbaus der Knorpelmatrix soll der räumliche Ablauf während der Knorpeldegradation näher untersucht werden (siehe Abbildung 33). Zwischen den einzelnen Schnitten können der Blauton der Färbung und die Farbintensität je nach Charge der Färbelösung und Färbedauer leicht variieren. Daher kann bei dieser Färbung keine quantitative Aussage über den Glykosaminoglykangehalt des Gewebes getroffen werden.

Betrachtet man die Alcianblaufärbung der Wildtypmaus bei pH 2.5 im Vergleich zu den Cholinesterase-Knockouts genauer (siehe Abbildung 33), so ist deutlich der Verlust der Blaufärbung von den ruhenden bis zu den hypertrophen Chondrozyten zu erkennen (siehe Abbildung 33, Alcianblau bei pH 2.5). In den beiden Einzel-Knockouts können die bei pH 2.5 gefärbten Proteoglykane nur in den distalen Enden des primären Ossifikationszentrums nachgewiesen werden. Hierbei zeigt die AChE-Mutante im Vergleich zur BChE-Mutante einen etwas höheren Anteil an Proteoglykanen. Dies deckt sich auch mit den Färbungen der Cholinesterase-Wholemouts (siehe Abbildung 33, AChE<sup>wt</sup>/BChE<sup>-/-</sup>, AChE<sup>-/-</sup>/BChE<sup>wt</sup>). Eine Ausnahme bildet die Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus. Bei dieser Mutante können in der Färbung im gesamten Knochenschaft saure carboxylierte und schwach sulfatierten Proteoglykane nachgewiesen werden (siehe Abbildung 33, AChE<sup>-/-</sup>/BChE<sup>-/-</sup>).

Vergleicht man die Alcianblaufärbungen bei pH 2.5 und pH 1.0 der Wildtypmaus miteinander, so fällt vor allem die zusätzliche Blaufärbung im primären Ossifikationszentrum und im bereits mineralisierten Knochen der Wildtypmaus auf (siehe Abbildung 33).

In der BChE-Knockout-Maus ist, wie auch bei pH 2.5, wieder eine Degradation der PGs in den ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten zu erkennen. Allerdings findet sich in den ruhenden und proliferierenden Chondrozyten, anders als bei pH 2.5, noch eine leichte Blaufärbung.



**Abbildung 33: Alcianblaufärbung bei pH 2.5 und pH 1.0 zeigt veränderte PG-Verteilung in den Mutanten**  
 Dargestellt sind die direkt gegenübergestellten Hinterextremitäten (P0) der Knorpel-Knochen-Wholemount-Färbungen im Vergleich zu den Gefrierschnitten. In der chondrogenen Zone der Epiphyse der Cholinesterasemutanten findet sich eine deutliche Degradation der PGs (blau). Die Doppelmutante zeigt eine zusätzliche Färbung im Knochenschaft. (Details siehe Text).

---

Ein weiterer sehr deutlich hervortretender Unterschied findet sich in den hypertrophen Chondrozyten der BChE-Mutante. Hier weisen die Chondrozyten, anders als in den anderen beiden Mutanten, eine deutliche Blaufärbung auf (siehe Abbildung 33, Alcianblau pH 1.0).

In der AChE-Knockout-Maus ist ebenfalls ein verminderter Proteoglykanteil in den ruhenden und proliferierenden Chondrozyten festzustellen. Es fällt jedoch auf, dass in der AChE-Mutante, anders als bei der BChE-Mutante, auch in den prähypertrophen Chondrozyten noch Proteoglykane nachgewiesen werden können. Diese PGs lassen sich auch im Bereich der hypertrophen Chondrozyten und im distalen Bereich des primären Ossifikationszentrums erkennen. Eine genaue Benennung der hypertrophen Zone fällt allerdings wegen der Desorganisation der Wachstumsfuge schwer (siehe Abbildung 33, Alcianblau pH 1.0).

Im Vergleich zu den beiden Einzel-Knockouts lassen sich in der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus bei pH 1.0 in der gesamten Wachstumsfuge in keinem einzigen Differenzierungsstadium der Chondrozyten mehr Proteoglykane nachweisen (siehe Abbildung 33, Alcianblau pH 1.0). Der Vergleich zur Alcianblaufärbung bei pH 2.5 zeigt keinen Unterschied im Vorkommen der verschiedenen Gruppen von Proteoglykanen. Im Gegenteil, es zeigt sich in beiden Färbungen eine deutliche Blaufärbung der Proteoglykane im primären Ossifikationszentrum und im Knochenschaft der Doppel-Knockout-Maus (siehe Abbildung 33, Alcianblau pH 1.0).

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass der Cholinesterase-Knockout zu einer Degradation der Proteoglykane in der chondrogenen Zone der Epiphyse bei pH 2.5 führt. Mit Hilfe der Alcianblaufärbung bei pH 1.0 kann diese Degradation noch etwas detaillierter betrachtet werden, da die stark sulfatierten Proteoglykane länger als die schwach sulfatierten Proteoglykane (pH 2.5) in den Skelettstrukturen erhalten bleiben (siehe Abbildung 33, Knochenschaft Wildtyp). Der Vergleich der unterschiedlichen Cholinesterase-Knockouts zeigt, dass in der BChE-Mutante die ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten eine deutliche Degradation aufweisen, während die Proteoglykane in der hypertrophen Zone noch erhalten bleiben. In der AChE-Knockoutmaus kann die hypertrophe Zone aufgrund der Desorganisation der Wachstumsfuge nicht mehr klar abgegrenzt werden (siehe Abbildung 32). Es zeigen sich dennoch einige verbleibende Proteoglykane in der prähypertrophen und hypertrophen Zone der Wachstumsfuge. Im Gegensatz dazu können in der Doppel-Knockout-Mutante keine Proteoglykane in den Chondrozyten der Epiphyse mehr

---

nachgewiesen werden, hier zeigt sich jedoch ein vermehrter Proteoglykananteil im primären Ossifikationszentrum und im Knochenschaft (siehe Abbildung 33, AChE<sup>-/-</sup>/BChE<sup>-/-</sup>).

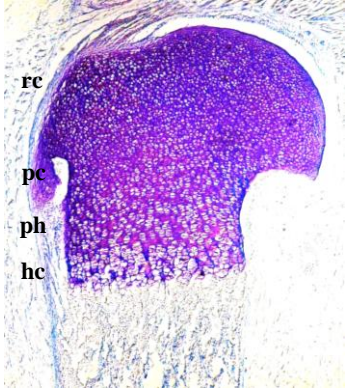

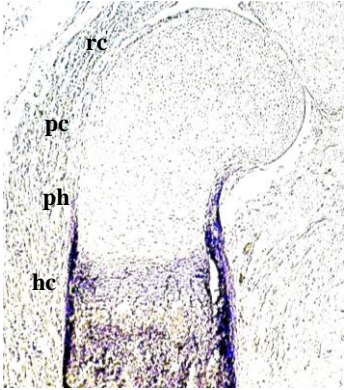

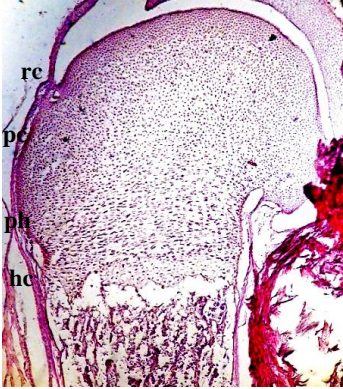
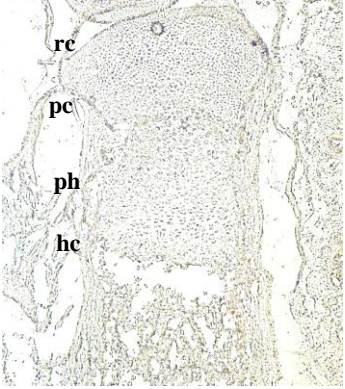
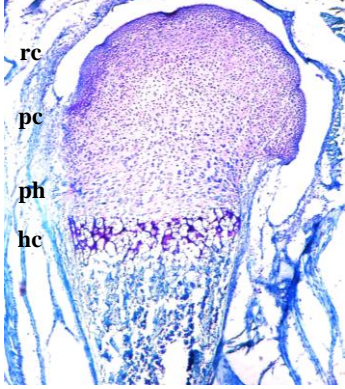
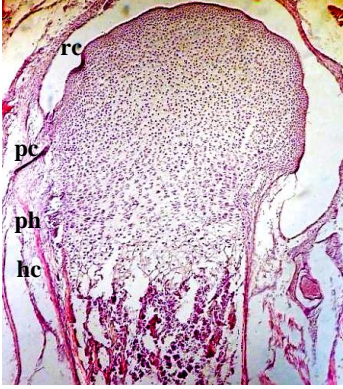
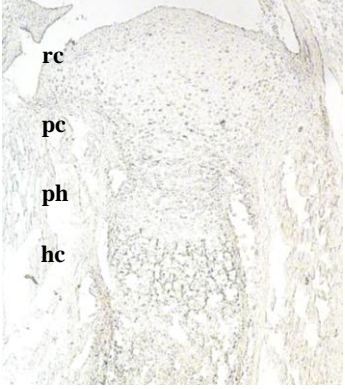
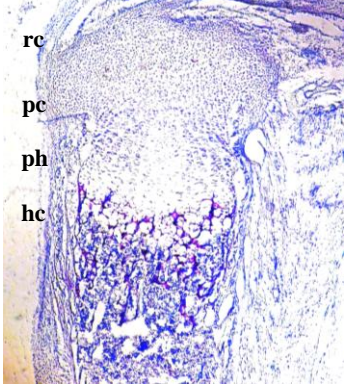
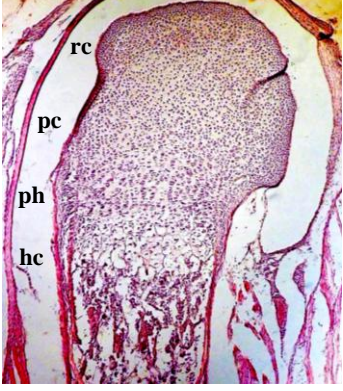
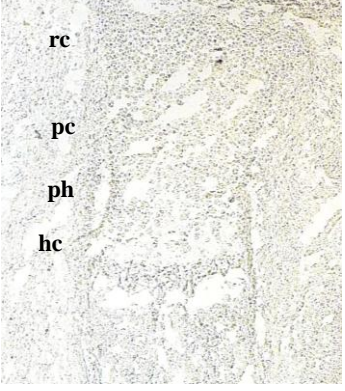
Zusätzlich zu den histologischen Färbungen mit Alcianblau wurde noch eine weitere spezifische Färbung der typischen Knorpelmatrixkomponenten, die Toluidin-Färbung, durchgeführt. Mit Hilfe dieser Färbung kann die Verteilung der nicht-mineralisierten Knorpelmatrix näher untersucht werden. In Abbildung 34 sind die Toluidin-, die Hämatoxylin-Eosin (HE)- Färbung und die alkalische Phosphatase-Aktivität in den Hinterextremitäten des Entwicklungsstadiums P0 der unterschiedlichen Cholinesterase-Knockout-Mäuse und der Wildtypmaus gegeneinander dargestellt.

Die nicht-mineralisierten Komponenten der Knorpelmatrix werden mit Hilfe von Toluidin spezifisch in einem Lilaton dargestellt. Während in der Wildtypmaus alle Stadien der differenzierten Chondrozyten eine intensive Lilafärbung der Knorpelmatrix aufweisen, zeigt die BChE-Mutante einen etwas schwächer ausgeprägten Lilaton (siehe Abbildung 34, Toluidin). Aufgrund der gleichen Färbedauer aller Schnitte ist die Farbintensität in dieser Färbemethode direkt proportional zum Anteil des nicht-mineralisierten Gewebes. Dies lässt darauf rückschließen, dass in der BChE-Mutante der Anteil an nicht-mineralisierter Knorpelmatrix im Vergleich zum Wildtyp bereits leicht vermindert ist. Zusätzlich fällt bei der BChE-Mutante eine untypische Lilafärbung im distalen Teil des primären Ossifikationszentrums auf (siehe Abbildung 34).

In der AChE-Mutante zeigt sich bei dieser Färbung ein stark veränderter Phänotyp. Hier kommt es an P0 zu einer starken Degradation der nicht-mineralisierten Knorpelmatrix in den ruhenden, den proliferierenden und den prähypertrophen Chondrozyten, was an der blassen Lilafärbung der Matrix deutlich zu erkennen ist. Bei genauerer Betrachtung scheint der Abbau der Matrixkomponenten von den ruhenden Chondrozyten bis zu den prähypertrophen Chondrozyten hin einem aufsteigenden Gradienten zu folgen. Lediglich die hypertrophen Chondrozyten zeigen eine weiterhin stark ausgeprägte Färbung ihrer Knorpelmatrix (siehe Abbildung 34). Die in der BChE-Mutante beobachtete Färbung des primären Ossifikationszentrums lässt sich in der AChE-Mutante nicht wiederfinden.

Am stärksten ist der Verlust der nicht-mineralisierten Matrixkomponenten des Knorpels in der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Mutante ausgeprägt zu sein (siehe Abbildung 34).



	Toluidin	Hämatoxylin/Eosin	Alkalische Phosphatase
AChE wt / BChE wt			
AChE wt / BChE -/-			
AChE -/- / BChE wt			
AChE -/- / BChE -/-			

**Abbildung 34: Histochemischer Nachweis von GAGs und ALP-Aktivität in den ChE-Mutanten zu P0**

In den Gefrierschnitten werden die PGs mit Toluidin (lila) angefärbt. Die Chondrozyten der Wachstumsfuge wurden mit Hilfe der HE-Färbung sichtbar gemacht und zeigt einen deutlichen Verlust der charakteristischen Gliederung in den ChE-Mutanten. Die PG-Färbung zeigt einen deutlichen Verlust der Knorpelmatrix in den Knockoutmutanten. Zusätzlich zeigt sich ein vollkommener Verlust der ALP-Aktivität in den hypertrophen Chondrozyten und im Knochenschaft der ChE-Mutanten.

---

In der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus kann dagegen weder in den ruhenden, noch in den proliferierenden oder prähypertrophen Chondrozyten eine Färbung der Matrixkomponenten beobachtet werden. Lediglich die Zone der terminalen hypertrophen Chondrozyten zeigt eine verbleibende Lilafärbung (siehe Abbildung 34). Darüber hinaus kann in dieser Mutante auch eine Färbung im distalen Ende des primären Ossifikationszentrums, die vergleichbar zu der Färbung in der BChE-Mutante ist, beobachtet werden (siehe Abbildung 34).

Die Übersichtsfärbung der Epiphysen mit HE zeigt noch einmal die Desorganisation der charakteristischen Gliederung der Differenzierungsstadien der Chondrozyten. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Grad der Deslokalisierung in der AChE- und der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Mutante am größten ist. Die BChE-Mutante scheint dagegen nur in einem geringen Maße von der Störung in der Chondrozytengliederung betroffen zu sein.

Betrachtet man die alkalische Phosphatase-Aktivität, ein Marker für hypertrophe Chondrozyten, terminale hypertrophe Chondrozyten und Osteoblasten, in den Cholinesterase-Knockout-Mutanten genauer, so fällt auf, dass sie in keiner der drei Knockout-Mutanten mehr nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu kann in der Wildtypmaus im Bereich des gesamten Periost, des Knochenschaftes und in den hypertrophen und terminalen hypertrophen Chondrozyten eine hohe Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abbildung 34). Betrachtet man die Aktivität der ALP über die gesamte frühe Extremitätenentwicklung hinweg, so wird deutlich, dass es bei dieser Herunterregulation der Aktivität einen bisher unbekannten zeitlichen Regulationsmechanismus zu geben scheint. Während der frühen Entwicklungsstadien E13.5 bis E18.5 kommt es in den Cholinesterasemutanten im Vergleich zur Wildtypmaus zu keinen sichtbaren Veränderungen in der Aktivität der ALP (Daten nicht gezeigt). Dies führt unter anderem dazu, dass es in der Kalzifizierung der Knochenmatrix, die zu einem Großteil von der alkalischen Phosphatase reguliert wird, zu keiner Ausbildung eines erkennbaren Phänotyps durch die Deletion der AChE- und BChE-Gene kommt.

Zusammen genommen zeigen die histochemischen Färbungen, dass die Gliederung der Wachstumszone in den verschiedenen Mutanten stark gestört ist. Darüber hinaus zeigt sich sowohl mit der Toluidin-, als auch mit der Alcianblaufärbung eine deutliche Degradation der Proteoglykane von den proliferierenden bis prähypertrophen Chondrozyten. Lediglich die hypertrophen und terminalen hypertrophen Chondrozyten scheinen von der Degradation weniger betroffen zu sein. Darüber hinaus zeigt die Untersuchung der alkalischen

---

Phosphatase-Aktivität, dass in keiner der drei Mutanten mehr eine Aktivität in den hypertrophen Chondrozyten, den terminalen hypertrophen Chondrozyten oder den Osteoblasten nachgewiesen werden konnte.

Um eine genauere Aussage über die, von der Mutation betroffenen Chondrozytentypen treffen zu können, werden die einzelnen Differenzierungsstadien mit Hilfe spezifischer Marker detailliert untersucht.

---

### **3.4 Molekulare Analyse der chondrogenen Markergene Col II, Col X, Ihh, MMP-13 und ALP**

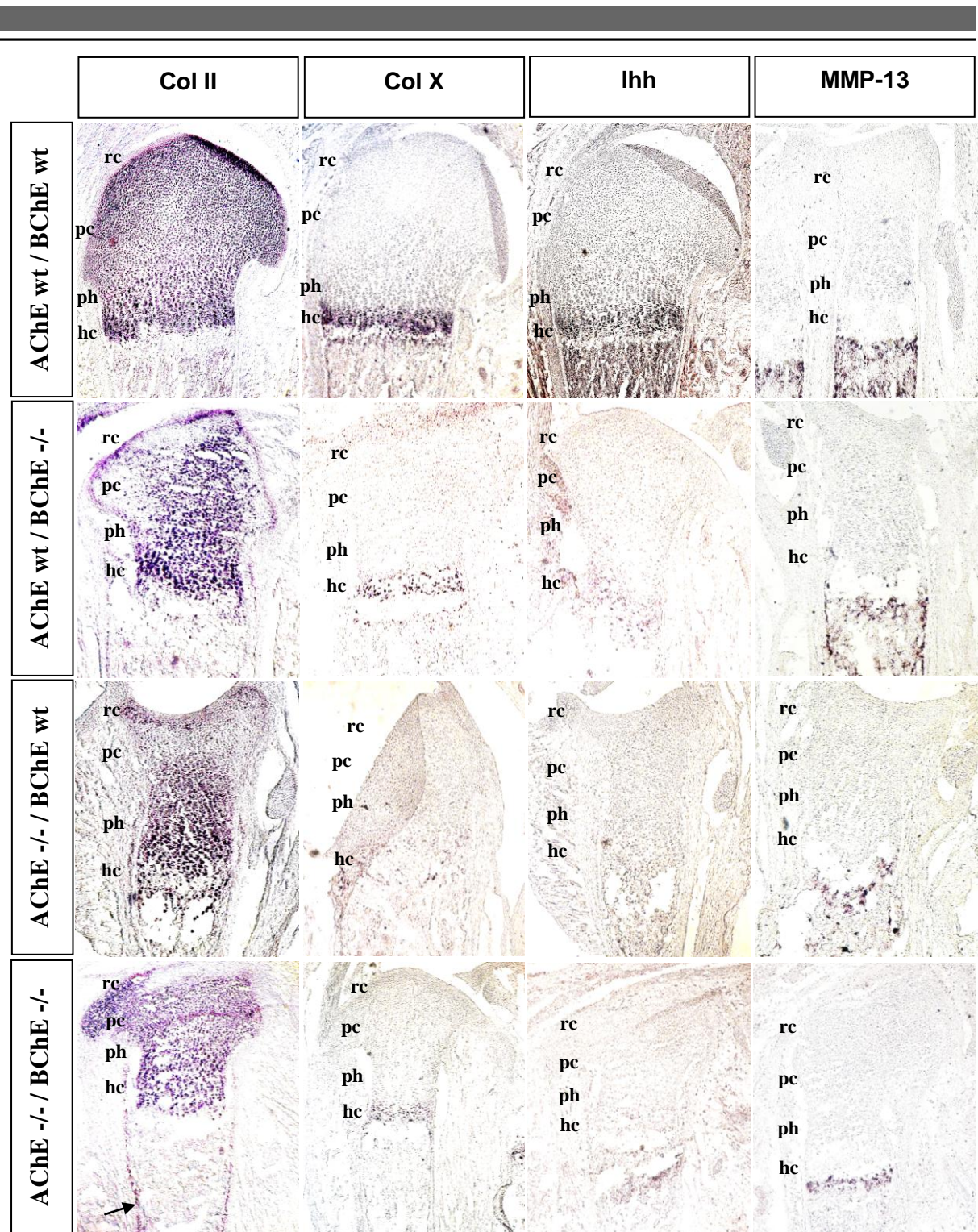
---

Die vorhergehenden histochemischen Untersuchungen der Extremitätenknochen der unterschiedlichen Cholinesterase-Knockout-Mäuse haben gezeigt, dass es sowohl in der Regulation der typischen Knorpelmatrix als auch in der Gliederung der Differenzierungstypen in der Wachstumsfuge zu starken Beeinträchtigungen kommt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Cholinesterase direkt oder indirekt an der Regulation der Chondrogenese beteiligt zu sein scheint. Die Analyse auf molekularer Ebene soll zeigen, welche Zelltypen bzw. Differenzierungsstadien der Chondrozyten im Einzelnen von der Mutation der AChE- und BChE-Gene betroffen sind. Hierzu wurden *in situ* Hybridisierungen (ISH) gegen die Transkripte von Kollagen Typ II (Col II), Kollagen Typ X (Col X), Indian Hedgehog (Ihh) und die Matrix-metalloproteinase MMP-13 durchgeführt.

Die in Abbildung 35 zusammengefasste Übersicht zeigt die Expressionsmustern der untersuchten Markergene in den Hinterextremitäten der unterschiedlichen Cholinesterase-Knockout-Mäuse zu P0.

Betrachtet man die Expression von Kollagen Typ II, ein Marker für die proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge genauer, so kann man einen detaillierten Überblick über den Zustand der undifferenzierten Knorpelanlage erhalten. In der Wildtypmaus ist eine deutliche Expression von Kollagen Typ II in den proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten zu erkennen. Dagegen zeigt die BChE-Mutante eine verminderte Kollagen Typ II Expression. Während die prähypertrophen Chondrozyten eine unveränderte Kollagen Typ II Expression aufweisen, nimmt die Expression in den proliferierenden Chondrozyten deutlich vom Knochenschaft zum Perichondrium hin ab (siehe Abbildung 35).





**Abbildung 35: Expression von Col II, Col X, Ihh und MMP-13 in den Cholinesterasemutanten zu P0**

In der Abbildung sind die Transkripte von Kollagen Typ II (Col II), Kollagen Typ X (Col X), Indian Hedgehog (Ihh) und Matrix-metalloproteinase 13 (MMP-13) in den Hinterextremitäten der unterschiedlichen Cholinesterase-Knockout-Mäuse im Vergleich zur Wildtypmaus zu P0 mittels der *in situ* Hybridisierung dargestellt. Durch die Deletion der Cholinesterasene Gene kommt es zu einem Verlust der Kollagen II-Expression in den proliferierenden den Zellen. Die AChE-Mutante zeigt einen Verlust an Kollagen X, ein Marker für hypertrophe Chondrozyten. Ihh, ein Marker für prähypertrophe und frühe hypertrophe Chondrozyten konnte in keiner der drei Cholinesterasemutanten nachgewiesen werden. Ruhende Chondrozyten (rc), proliferierende Chondrozyten (pc), prähypertrophe Chondrozyten (ph) und hypertrophe Chondrozyten (hc).



---

Lediglich die am Knochenkopf anliegende Knorpelhaut zeigt noch eine deutliche Kollagenexpression in der chondrogenen Schicht des Perichondriums (siehe Abbildung 35).

In der AChE-Mutante zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Verlust der Kollagen Typ II Expression in den proliferierenden Chondrozyten, während die Expression in den prähypertrophen Chondrozyten von der Mutation im AChE-Gen nicht betroffen zu sein scheint. In der Cholinesterase-Doppel-Knockoutmaus ist keine veränderte Kollagenexpression in der Wachstumsfuge erkennbar. Allerdings kommt es bei dieser Mutante zu einer zusätzlichen Expression von Kollagen Typ II im Periost der Extremitätenknochen (siehe Abbildung 35, Pfeil).

Einen weiteren relevanten Differenzierungsmarker während der Skelettentwicklung stellt Kollagen Typ X dar. Es handelt sich hierbei um einen bekannten Marker, der charakteristisch für die hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge ist, was sich am Expressionsmuster der Wildtypmaus deutlich widerspiegelt. Hierbei überschneidet sich die Expression von Kollagen Typ X allerdings auch teilweise mit den terminalen hypertrophen Chondrozyten der Mineralisierungszone. In der BChE-Mutante ist zwar auch eine spezifische Expression von Kollagen Typ X in den hypertrophen Chondrozyten zu erkennen, der Anteil der positiven Zellen ist jedoch im Vergleich zur Wildtypmaus deutlich geringer (siehe Abbildung 35). In Folge der Deletion des AChE-Gens kommt es in der AChE-Mutante zu einem kompletten Verlust der Kollagen Typ X-Expression in den hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge. In der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus ist zwar wieder eine Kollagenexpression in der Wachstumsfuge erkennbar, diese fällt jedoch im Vergleich zur Wildtypmaus und zur BChE-Mutante sehr viel schwächer aus. Die Deletion der beiden Cholinesterasene, AChE und BChE, führt demnach zu einer stark verminderten Kollagen Typ X-Expression (siehe Abbildung 35).

Indian Hedgehog (Ihh), ein weiterer bekannter Regulator der Chondrozytendifferenzierung wird von den prähypertrophen und den anfänglichen hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Die Untersuchung des Expressionsmusters von Ihh zeigt, wie schon für Kollagen Typ X beschrieben, einen dramatischen Verlust in den Cholinesterasemutanten. Ihh kann in der BChE-Mutante und in der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus lediglich in einigen vereinzelten Zellen gezeigt werden. In der AChE-Mutante konnte im Vergleich zur Wildtypmaus gar keine Ihh-Expression mehr in den prähypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35).

---

Die Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13) ist ein Kollagen-spaltendes Protein, welches von den terminalen hypertrophen Chondrozyten und den Osteoblasten gebildet wird, um die Knochenmatrix auf die Resorption durch die Osteoklasten vorzubereiten. Das Expressionsmuster von MMP-13 ist im Wildtyp deutlich im Bereich der terminalen hypertrophen Chondrozyten am Übergang von der Wachstumsfuge zum Knochenschaft lokalisiert. Darüber hinaus zeigt sich eine starke Expression in der Diaphyse und dem angrenzenden Periost.

Die BChE-Mutante weist im Vergleich zum Wildtyp eine klar verminderte Expression von MMP-13 im Knochenschaft und den terminalen hypertrophen Chondrozyten auf, während das Periost weiterhin stark positiv ist. Betrachtet man im Vergleich dazu die AChE-Mutante so ist die herunter geregelte Expression von MMP-13 in dieser Mutante deutlich im Knochenschaft zu erkennen. Während die terminalen hypertrophen Chondrozyten am Übergang zum Knochenschaft eine klare Färbung zeigen, können im Knochenschaft nur noch einzelne Zellen positiv markiert werden (siehe Abbildung 35). Der ausgeprägteste Verlust zeigt sich in der Cholinesterase-Doppelmutante. Hier konnte die MMP-13 Expression nur noch in den terminalen hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden. Der gesamte Knochenschaft und das angrenzende Periost ist für MMP-13 negativ (siehe Abbildung 35).

Zusammengenommen zeigen die *in situ* Hybridisierungsstudien, dass die Cholinesterase-Mutanten eine deutliche Herunterregulation in allen chondrogenen Markern zeigen. In der BChE-Mutante findet sich eine leichte Verminderung der Kollagen Typ II Expression in den ruhenden und proliferierenden Chondrozyten. Kollagen Typ X wurde ebenfalls vermindert in den hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen. Ihh ist dagegen in der BChE-Mutante zu P0 überhaupt nicht mehr exprimiert. Zusätzlich zeigte die Mutante eine deutliche Verminderung der MMP-13 Expression in den terminalen hypertrophen Chondrozyten und dem Knochenschaft.

In den Extremitätenknochen der AChE-Mutante zu P0 konnten dagegen weder Kollagen Typ X noch Ihh nachgewiesen werden. Die Kollagen Typ II-Expression war zusätzlich in den proliferierenden Chondrozyten negativ. Die MMP-13-Expression zeigte außerdem eine deutliche Verminderung der positiven terminalen hypertrophen Zellen. Im Knochenschaft konnten nur noch einzelne MMP-13 positive Zellen nachgewiesen werden.

In der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus konnte ebenfalls keine Ihh-Expression mit nachgewiesen werden. Die Kollagen Typ X-Expression in den hypertrophen Chondrozyten

---

und die MMP-13-Expression in den terminalen hypertrophen Chondrozyten war stark vermindert. Darüber hinaus konnte MMP-13 nicht mehr im Knochenschaft oder Periost nachgewiesen werden, während im Periost, anders als in den beiden Einzelmutanten, eine zusätzliche Expression von Kollagen Typ II beobachtet werden konnte.

---

### **3.5 Aufklärung des cholinergen Regulationsmechanismus *in vitro***

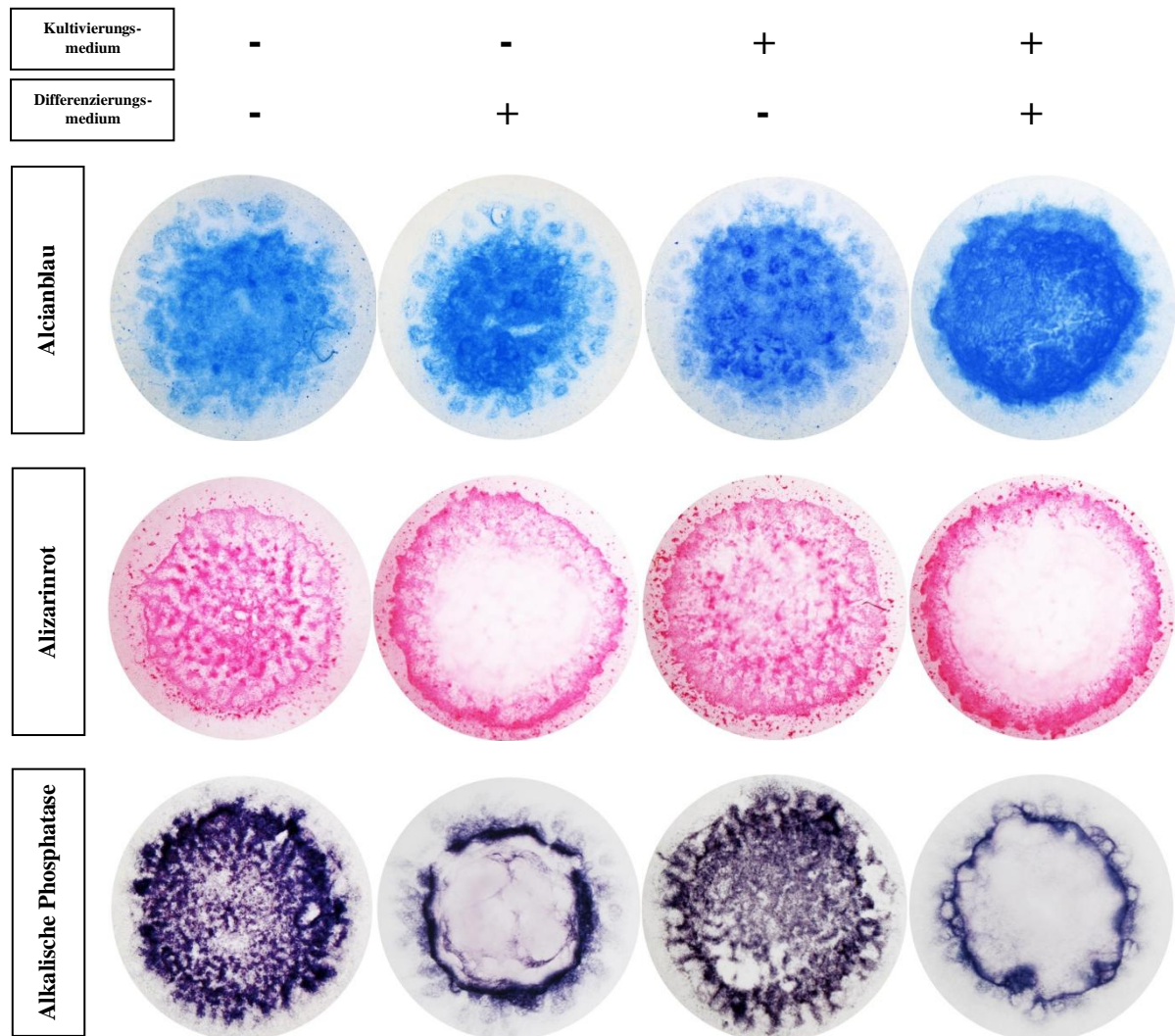
---

Nachdem die durchgeführten *in vivo* Experimente am Huhn und die ausgewerteten Defekte der Cholinesterase-Knockout Mäuse eine deutliche Beteiligung der Cholinesterase in der Skeletogenese nachgewiesen haben, soll in einem weiteren Ansatz geklärt werden, inwiefern diese Funktion über die klassische Rolle des Enzyms im nicht-neuronalen cholinergen System vermittelt wird. Neben der Cholinesterase wurden auch schon andere Komponenten des nicht-neuronalen cholinergen Systems, wie zum Beispiel die Acetylcholinrezeptoren oder die Cholinacetyltransferase, in Chondrozyten oder Osteoblasten nachgewiesen. Bisher konnten dem cholinergen System jedoch noch keine Regulationsmechanismen in der endochondralen Ossifikation zugewiesen werden. Mit Hilfe der Micromasskultur sollen *in vitro* die Defekte des Cholinesterase-Knockouts aus der Maus simuliert und anschließend verschiedene Komponenten gezielt inhibiert werden, um die einzelnen regulatorischen Komponenten anschließend identifizieren zu können.

Bei der Micromasskultur handelt es sich um ein *in vitro* Kultursystem, bei dem aus etwa 20 Hühnerembryonen im Stadium HH 21-23 die Extremitätenknospen abgetrennt, das Ektoderm entfernt und die vereinzelter mesenchymalen Zellen in eine High-density Kultur (siehe Methoden S. 37) gebracht werden. Dieses Kultursystem hat sich in den letzten Jahrzehnten als eines der wichtigsten Modellsysteme zur Analyse zellulärer und molekularer Prozesse der Chondrogenese etabliert. In der weiterentwickelten Langzeitkultivierung können neben der Chondrogenese auch Prozesse der Chondrozytenreifung, der Hypertrophie, der Kalzifizierung und der Apoptose in ihrem spezifischen Ablauf voneinander unterschieden werden (Mello und Tuan, 1999). In den bisher veröffentlichten Arbeiten, unter den darin beschriebenen Kulturbedingungen, treten die Chondrozyten und „Osteoblasten“ dabei immer in identischen Bereichen ko-lokalisiert auf. Dies unterstützt das Kultursystem als Modellsystem für die Untersuchung der regulatorischen Prozesse der endochondralen Ossifikation. Während die Knorpelmatrix in der Kultur langsam abgebaut wird, bildet sich in diesen Bereichen zu einer

parallel ansteigenden alkalischen Phosphatase-Aktivität eine vermehrte kalzifizierte Matrix aus (Mello und Tuan, 1999, Ulici et al., 2008).

Bevor die Untersuchung der AChE-Inhibition in diesem Kultursystem gestartet wurde, habe ich versucht, die Kulturbedingungen soweit an die *in vivo* Situation anzupassen, dass es auch in der *in vitro* Kultur zu einer räumlichen Trennung der beiden Zelltypen kommt.



**Abbildung 36: Zugabe von 2% CS führt in div 13 zur räumlichen Trennung der Knorpel- und Knochenzellen**

In der Abbildung sind 13 Tage lang kultivierte Micromasskulturen, die in ihrem Kultur- und Differenzierungsmedium unterschiedliche Kombinationen an Hühnerserum (mit CS: +, ohne CS: -) zugegeben bekommen haben, dargestellt. Die Proteoglykane der chondrogenen Zellen werden durch Alcianblau, die kalzifizierte Matrix mit Alizarinrot angefärbt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase, ein Marker für die frühe osteogene Differenzierung, wird durch eine Lilafärbung dargestellt. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von CS ins Differenzierungsmedium zu einer räumlichen Trennung von Zellen führt, die zum einen eine Proteoglykan-haltige und zum anderen eine kalzifizierte Matrix produzierenden. Parallel dazu konzentriert sich die vorher gleichmäßig verteilte ALP-Aktivität bei CS Behandlung in den Übergangsbereich zwischen den Zellen mit einem chondrogenen Phänotyp und den Zellen der kalzifizierenden Zone.

---

Aufgrund der Erfahrung unseres Labors mit der Primärkultur von embryonalen Retinazellen wurde dem aus einer Vielzahl von Studien zur Chondrogenese bekannten Differenzierungsmedium für Micromasskulturen zusätzlich 2% Hühnerserum hinzugegeben. Aus den Retinakulturen ist bereits bekannt, dass die Zugabe von Hühnerserum die Differenzierungsprozesse und die räumliche Anordnung der Zellen positiv beeinflusst.

Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, wurde dem Kultivierungsmedium und dem Differenzierungsmedium in unterschiedlichen Kombinationen das Hühnerserum hinzugegeben. Die Micromasskulturen sind an Kulturtag 13 fixiert und auf ihre Knorpel- und Knochendifferenzierung hin untersucht worden. Als spezifischen Marker für die Mineralisierung der *in vitro* Kultur habe ich zusätzlich auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase überprüft. Der Vergleich der unterschiedlichen Kombinationen der beiden verwendeten Medien zeigt, dass es bei der Zugabe von Hühnerserum ins Differenzierungsmedium zu einer deutlichen Trennung der Knorpel- und Knochenzellen kommt.

Der Nachweis der Proteoglykane mittels Alcianblau weist darauf hin, dass es sich bei diesen Zellen um chondrogene Zellen handelt. Diese haben sich mit Hilfe des Differenzierungsmediums aus den vorherigen undifferenzierten mesenchymalen Vorläuferzellen entwickelt. Während der weiteren Kultivierung beginnen die Zellen zusätzlich kalzifizierte Matrix zu produzieren. Hierbei zeigt sich jedoch, dass es bei der zusätzlichen Gabe von Hühnerserum ins Differenzierungsmedium zu einer räumlichen Veränderung der, durch Alizarinrot nachgewiesenen, mineralisierten Matrix kommt. Während in den Kulturen ohne Hühnerserum die mineralisierte Matrix in der gesamten Kultur gleichmäßig verteilt ist, zeigt sich bei der Zugabe von Hühnerserum eine äußere ringförmige Struktur, die die Zellen mit einem chondrogenen Phänotyp (blau) vollständig umschließt (siehe Abbildung 36).

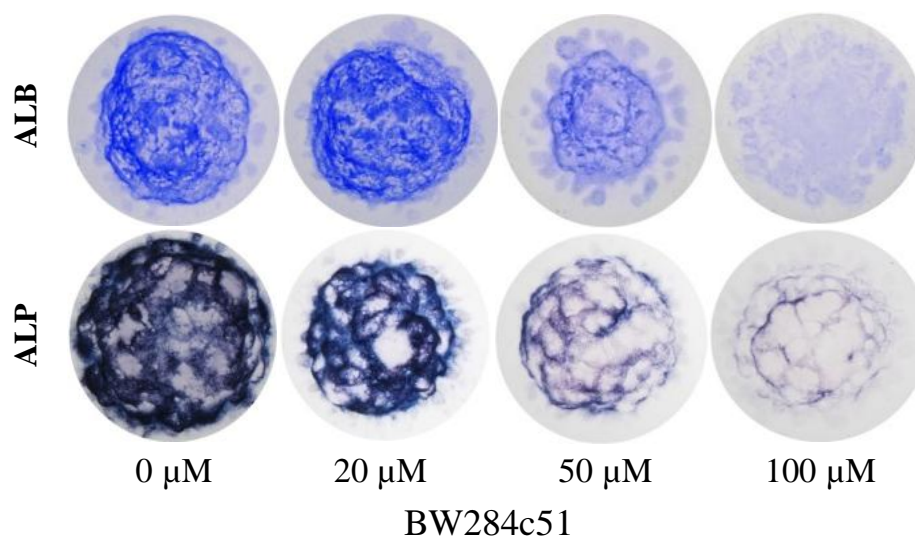
Betrachtet man die Verteilung der alkalischen Phosphatase-Aktivität näher, so fällt auf, dass in der unbehandelten Kultur auch die Phosphataseaktivität über die gesamte Kultur gleichmäßig verteilt ist. Im Gegensatz dazu zeigt die Zugabe von 2% Hühnerserum ins Differenzierungsmedium eine Verlagerung der alkalischen Phosphatase Aktivität in den ungefärbten Übergangsbereich zwischen den chondrogenen und den kalzifizierenden Zellen. Mit Hilfe der so veränderten Kulturbedingungen stellt die Micromasskultur ein ideales

---

Modellsystem für die Untersuchung des nicht-neuronalen cholinergen Systems in der Chondrogenese dar.

Um die in den Mausmutanten beobachteten Effekte in der Knorpeldegradation simulieren zu können wurde die primäre *high-density* Micromasskultur nach der Präparation für zwei Tage im Kulturmedium ohne Hühnerserum kultiviert. Ab dem dritten Kulturtag (div 3) werden alle Kulturen dann mit dem Differenzierungsmedium plus 2% Hühnerserum kultiviert. Parallel dazu wurde ab diesem Kultivierungstag die AChE in einer aufsteigenden Konzentration des Inhibitors BW284c51 (20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) über den gesamten weiteren Kultivierungszeitraum kontinuierlich inhibiert. Die so behandelten Kulturen sind am Kulturtag div 13 fixiert und mit Hilfe standardisierter histologischer Färbemethoden auf die Entwicklung und Differenzierung der mesenchymalen Zellen hin untersucht worden.

In Abbildung 37 ist der Einfluss der AChE-Inhibition auf die Prozesse der Knorpeldifferenzierung deutlich zu erkennen.



**Abbildung 37: AChE Inhibition führt in der *in vitro* Micromasskulturen zur Knorpeldegradation**

Die Abbildung zeigt die mit unterschiedlichen Konzentrationen des AChE-Inhibitors BW284c51 behandelten Micromasskulturen zu Kulturtag 13. Die PGs und GAGs der Knorpelmatrix sind durch Alcianblau (ALB) angerfärbt. Die Alkalische Phosphataseaktivität (ALP) ist durch eine intensive tiefblaue Färbung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Inhibition der AChE mit zunehmender Konzentration zu einer Verminderung der Proteoglykane und Glykosaminglykane, die einen Hauptbestandteil der Knorpelmatrix ausmachen, führt. Gleichzeitig nimmt die Aktivität der alkalischen Phosphatase ebenfalls konzentrationsabhängig ab.

Betrachtet man sich die *in vitro* Micromasskulturen an Kulturtag 13 genauer, so ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit unterschiedlichen BW284c51 Konzentrationen zu einer dramatischen Verminderung der Blaufärbung - was direkt einen Abbau der Knorpelmatrix

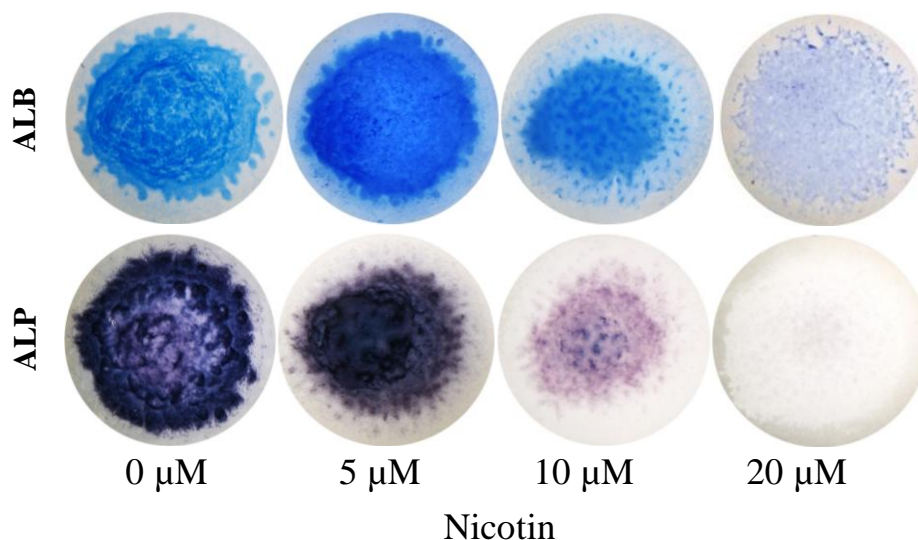
---

anzeigt - einhergeht. Demnach ist es möglich die *in vivo* in den Mausmutanten beobachtete Knorpeldegradation *in vitro* zu simulieren. Auch die damit verbundene verringerte ALP Aktivität der Chondrozyten konnte *in vitro* nachgestellt werden (siehe Abbildung 37).

Um die Frage zu klären, ob die beobachteten Cholinesterase-Effekte von der klassischen Funktion der AChE in der Termination der Signaltransduktion im nicht-neuronalen cholinergen System abhängt, wurden die Micromasskulturen in einem daran anschließenden Versuch mit Nicotin, einem Analogon des Acetylcholins, behandelt.

Hierbei wurde den *in vitro* Kulturen ab dem dritten Kultivierungstag in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe Nicotin (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) hinzugegeben. Die so behandelten Kulturen sind ebenfalls am Kulturtag div 13 fixiert und mit Hilfe standardisierter histologischer Färbemethoden auf die Entwicklung und Differenzierung der mesenchymalen Zellen hin untersucht worden.

In Abbildung 38 ist deutlich zu erkennen, dass eine Nicotin-Behandlung ebenfalls drastische Defekte in der Knorpelmatrixdegradation und in der verminderten ALP Aktivität bewirkt. Dass die Nicotin-Behandlung zu den gleichen Defekten wie die AChE-Behandlung führt bestätigt die Annahme, dass die vorher beobachteten Cholinesterase-Defekte auf die klassische Funktion als Enzym zurückzuführen sind.



**Abbildung 38: Nicotinbehandlung führt in der *in vitro* Micromasskulturen zur Knorpeldegradation**

Die Abbildung zeigt die mit unterschiedlichen Nicotin Konzentrationen behandelten Micromasskulturen an Kulturtag 13. Die PGs und GAGs der Knorpelmatrix sind durch Alcianblau (ALB) angerfärbt. Die Alkalische Phosphataseaktivität (ALP) ist tiefblau dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Nicotin-Behandlung mit zunehmender Konzentration zu einer Verminderung der PGs und GAGs führt, während gleichzeitig die Aktivität der alkalischen Phosphatase konzentrationsabhängig abnimmt.

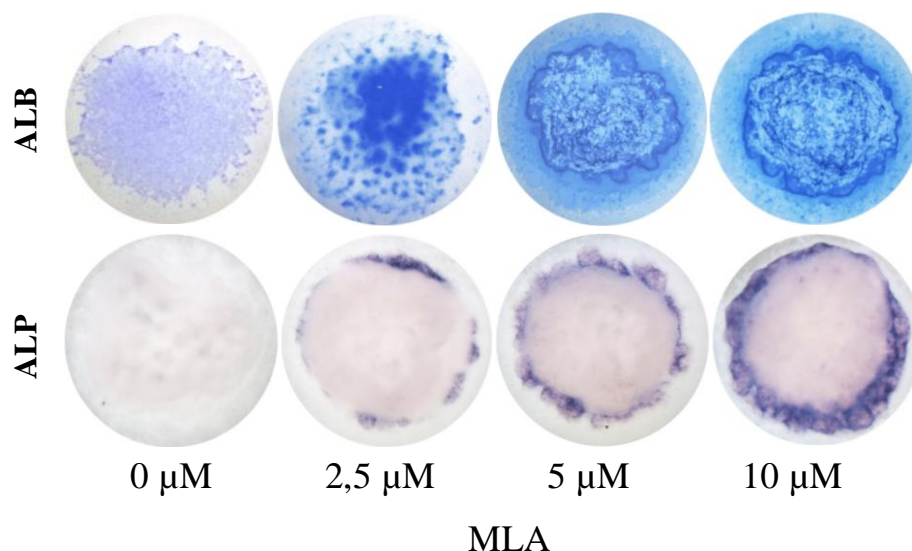


---

Wird im nicht-neuronalen cholinergen System die AChE inhibiert, steigt der ACh-Spiegel aufgrund des fehlenden enzymatischen Abbaus kontinuierlich. Eine weitere wichtige Komponente des nicht-neuronalen cholinergen Systems stellt in diesem Zusammenhang der Acetylcholinrezeptor dar. Wird das ACh nicht mehr durch die AChE abgebaut, kommt es zwangsläufig zu einer erhöhten Aktivierung dieses Rezeptors.

In einem weiteren Versuch soll geklärt werden, inwiefern der AChR in der Vermittlung der beobachteten Defekte eine Rolle spielt. Hierzu wird der nikotinische Acetylcholinrezeptor, der bereits in den proliferierenden und prä-hypertrophen murinen und humanen Chondrozyten nachgewiesen werden konnte, spezifisch durch Methyllycaconitine (MLA) inhibiert. Dazu wurden die Micromasskulturen ab dem dritten Kultivierungstag mit einer gleichbleibenden Konzentration an Nicotin ( $20\text{ }\mu\text{M}$ ) behandelt. Um die Rolle der nAChR in der Vermittlung der Knorpeldegradationsdefekte bestimmen zu können wurden die so behandelten Kulturen zusätzlich mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe an MLA behandelt ( $2,5\text{ }\mu\text{M}$ ,  $5\text{ }\mu\text{M}$ ,  $10\text{ }\mu\text{M}$ ). Auch diese Kulturen wurden am Kulturtag div 13 fixiert und mit Hilfe standardisierter histologischer Färbemethoden auf die Entwicklung und Differenzierung der mesenchymalen Zellen hin untersucht.

In Abbildung 39 ist der Einfluss der nAChR-Inhibition auf die durch Nicotin vermittelte Knorpeldegeneration deutlich zu erkennen.



**Abbildung 39: MLA-Behandlung kann Nicotin-bedingter Knorpeldegradation entgegenwirken**

Die Abbildung zeigt die mit  $20\text{ }\mu\text{M}$  Nicotin und aufsteigenden Konzentrationen an MLA behandelten Micromasskulturen an Kulturtag 13. Die PGs und GAGs der Knorpelmatrix sind durch Alcianblau (ALB) angerfärbt. Die Alkalische Phosphataseaktivität (ALP) ist tiefblau dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die durch die Nicotin-Behandlung einsetzende Knorpeldegradation und die Verminderung der ALP-Aktivität konzentrationsabhängig durch die Gabe von MLA rückgängig gemacht werden kann.



---

Bei der gleichzeitigen Behandlung mit Nikotin und MLA kann in den *in vitro* Kulturen beobachtet werden, dass die durch Nikotin verursachte Degradation der Knorpelmatrix und die inhibierte ALP Aktivität durch die Inhibition des nAChR in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise wieder rückgängig gemacht werden kann.

Zusammenfassend lässt sich zu den durchgeführten *in vitro* Versuchen sagen, dass sowohl die AChE-Inhibition als auch die Nicotin-Behandlung zu den gleichen Defekten führt. Diese Degradationseffekte konnten im Vorfeld auch schon in den Cholinesterase-Mausmutanten beobachtet werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass es möglich ist die Knorpeldegradation durch Inhibition des nAChR wieder rückgängig zu machen. Die Regulation der Chondrozytendifferenzierung während der endochondralen Ossifikation scheint demnach über das nicht-neuronale cholinerge System reguliert zu werden, wobei die Hauptkomponente der nAChR zu sein scheint.

---

## **4 Diskussion**

---

### **4.1 Räumliches und zeitliches AChE-Aktivitätsmuster in der frühembryonalen Knorpelanlage**

---

Nach der Etablierung des Farbnachweises der enzymatischen Cholinesteraseaktivität durch die Herren Karnovsky und Roots im Jahr 1964 (Karnovsky und Roots, 1964) wurden mehrere Expressionsstudien zur Lokalisation der Cholinesterasen in unterschiedlichen Organen, Geweben und Zellen durchgeführt. Im Jahr 1971 wurde von Drews und Drews (Drews, 1972) die erste Studie zur Expression der Cholinesteraseaktivität während der frühen Extremitätenentwicklung im Huhn publiziert. Darauf aufbauende Arbeiten von Schröder, Falugi und Alber haben (Schröder, 1980; Falugi, 1985; Alber et al., 1994), aufgrund der Entdeckung spezifischer Cholinesteraseinhibitoren, die Drews-Studie noch durch die differenzierte Betrachtung der AChE- und BChE-Aktivität erweitert und mögliche Konzepte zur Funktion der AChE in diesem frühen embryonalen Gewebe diskutiert.

In der vorgestellten Aktivitätsstudie der AChE über den gesamten Zeitraum der frühen Extremitätenentwicklung konnten die einzelnen, von Drews und Falugi (Drews, 1972; Falugi, 1985) beschriebenen Aktivitätsmuster, bestätigt und um neue Aktivitätszentren erweitert werden. Bei den hier gezeigten und diskutierten Ergebnissen der Aktivitätsstudie ist jedoch darauf zu achten, dass mit der Karnovsky Roots Färbemethode nur enzymatisch aktive Acetylcholinesterasen berücksichtigt werden können. Wie aus einer Vielzahl von Studien bekannt ist, gibt es jedoch unterschiedliche Isoformen der AChE (Grisaru et al., 1999; Meshorer et al., 2006), die in löslicher oder membrangebundener Form vorkommen können. Einige dieser Isoformen sind enzymatisch inaktiv oder weniger stabil, was sie gegenüber Temperaturschwankungen oder den Fixierungen äußerst empfindlich macht. Solche Isoformen lassen sich daher nur schwer mit Hilfe dieser Färbemethode anfärben.

Zum Entwicklungszeitpunkt HH 16-19 lässt sich in der Extremitätenknospe eine erhöhte AChE Aktivität im Ektoderm und besonders in der apikalen ektodermalen Randleiste (AER) nachweisen. Der mesodermale Kern der Hühnerextremität weist dagegen zu diesem Zeitpunkt keine Acetylcholinesteraseaktivität auf. Falugi konnte in ihrer Studie zeigen, dass die AChE Aktivität zu HH 16-18 besonders um den Zellkern und an der Plasmamembran der ektodermalen Zellen, einschließlich der AER lokalisiert ist (Falugi, 1985).

---

Die AER ist ein bedeutendes Organisationszentrum, das sich während der Extremitätenentwicklung entlang der antero-posterioren Achse des Knospenektoderms etabliert und dort die Proliferation in der Wachstumszone (PZ) stimuliert, wodurch der distale Auswuchs der Extremität gesteuert wird. Ab dem Entwicklungsstadium HH 20 beginnt eine Auflockerung des mesodermalen Gewebes, mit der eine vermehrte AChE Aktivität im ventralen Bereich der Extremitätenknospe einhergeht. Das dorsal gelegene, noch kompakte mesodermale Gewebe bleibt dagegen weiterhin AChE-negativ. In den folgenden Entwicklungsstadien (HH 22-25) verlagert sich das AChE-positive Gewebe in der Extremitätenknospe langsam von ventral nach zentral.

In dem aufgelockerten Mesoderm beginnt zu HH 23 die Knorpelkondensation der Skelettanlagen (Goldring et al., 2006). In den Gefrierschnitten ist deutlich zu erkennen, dass die an der Kondensation beteiligten Zellen eine verstärkte AChE Aktivität aufweisen, die wieder abnimmt, sobald die Organisation der Knorpelanlage abgeschlossen ist (Drews, 1972). In der angefertigten Wholemount-Färbung lässt sich in den Entwicklungsstadien HH 19-25 noch eine weiter AChE-positive Struktur beschreiben. So tritt in HH 19 erstmals eine hufeisenförmige Struktur im distalen Bereich der frühen Extremitätenknospe auf. Diese wächst in den folgenden Entwicklungstagen weiter nach distal aus. In HH 25 umrandet die AChE-positive Struktur den inneren, aufgelockerten mesodermalen Kern.

Nachdem bereits Drews die Beobachtung gemacht hat, dass die Cholinesterase gerade während der Aggregationsprozesse der Knorpelanlage stark in den Chondroblasten exprimiert ist und mit der Differenzierung in Chondrozyten verschwindet (Drews, 1972), hat Falugi in ihrer Arbeit versucht, einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der AChE und dem Aggregationsprozess der Chondroblasten herzustellen (Falugi, 1985). Sie vermutete, dass die AChE durch die Lokalisation in der Zellmembran für zelluläre Interaktionen bedeutend sein könnte und über diese Interaktionen Zellbewegungen und morphogenetische Prozesse reguliert werden könnten. Darüber hinaus konnte Genever in einer *in vitro* Studie zeigen, dass auch die Osteoblasten in der Lage sind AChE zu sekretieren (Genever et al., 1999). Genever vermutete hierbei, dass die AChE als Zelladhäsions-Molekül an der Vermittlung der Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sein könnte.

Zusammengenommen bestätigen die Ergebnisse dieser Aktivitätsstudie, dass eine erhöhte AChE Aktivität in den Knorpelanlagen zu Zeiten der Aggregation der Chondroblasten zu finden ist und ab HH 29 mit der Differenzierung zu Chondrozyten, im zentralen Bereich der

---

Knorpelanlage, verschwindet (Drews, 1972; Schröder, 1980). Obwohl das Aktivitätsmuster der AChE in den embryonalen Knorpelanlagen bereits seit über 40 Jahren bekannt ist, gibt es bisher nur wenige *in vivo* Studien zur Funktion der Acetylcholinesterase in der Skeletogenese (Misawa et al., 1982; Compston et al., 1999). Die aktuellen Studien legen ihr Hauptaugenmerk vor allem auf die Funktion der AChE in der Osteoblastendifferenzierung (Genever et al., 1999; Inkson et al., 2004;). Dies ist dahingehend besonders interessant, da neue Studien zeigen können, dass die AChE zu späteren Entwicklungsstadien (HH 37) auch in der Wachstumszone und dem primären Ossifikationszentrum eine schwache Aktivität aufweist. Die BChE zeigt dagegen besonders in der Diaphyse des Knochens, dort wo die Ossifikation gerade stattfindet, eine sehr starke Aktivität (Vogel-Höpker et al., 2010).

---

## **4.2 *In vivo* AChE-Inhibition führt zum Verlust der Knochenmineralisierung**

---

Ziel dieser Doktorarbeit war es eine mögliche funktionelle Regulation des nicht-neuronalen cholinergen Systems während der embryonalen Skeletogenese näher zu untersuchen. Hierbei lag das Hauptaugenmerk im ersten Teil der Arbeit besonders auf der Acetylcholinesterase. Zum näheren Verständnis des Einflusses der Acetylcholinesterase auf die Chondrogenese und die Osteogenese wurden Hühnerembryonen in unterschiedlichen Stadien mit verschiedenen AChE-Inhibitoren behandelt. Für die Auswahl der Inhibitoren wurde hierbei auf die spezielle Struktur der AChE eingegangen. So zeichnet sich dieses Enzym im Besonderen dadurch aus, dass es neben der katalytischen Domäne auch eine periphere Bindedomäne besitzt, was dem Enzym zusätzlich Fähigkeiten eines Adhäsionsmoleküls verleiht (Johnson et al., 2003; Paraoanu et al., 2005). Um in dieser Studie näher auf die Frage eingehen zu können, ob die Funktion der AChE in der Skeletogenese auf die enzymatische Funktion oder die Funktion als Zelladhäsionsmolekül zurückzuführen ist, wurden die einzelnen Bindedomänen der AChE gehemmt. Der erste Inhibitor, BW284c51, gehört zu den „dualbindenden“ Inhibitoren und bindet sowohl an der katalytischen als auch an der peripheren Bindedomäne der AChE (Felder et al., 2002). Bei dem zweiten ausgewählten Hemmstoff handelt es sich um den MAB 304 AChE-Antikörper, der nur an der peripheren Domäne des Enzyms bindet, wodurch die enzymatische Aktivität der AChE unbeeinflusst bleibt (Fambrough et al., 1982; Sharma und Bigbee, 1998).

Die Auswertung der Manipulationsexperimente hat ergeben, dass es sowohl bei der Verwendung des BW284c51-Inhibitors als auch bei der Verwendung des MAB 304-

---

Antikörpers zu einem Verlust der Mineralisierung des primären Ossifikationszentrums kommt. Die Knorpelstrukturen, sowie die Länge und Dicke der Skelettstrukturen, zeigten in den behandelten Extremitäten keinerlei Auffälligkeiten.

Die Ausprägung des Mineralisierungsverlustes variiert jedoch zwischen den einzelnen Behandlungen und Individuen leicht. So zeigten die mit BW-behandelten Embryonen in allen Fällen einen vollständigen Verlust der Mineralisierung, während es in der MAB 304-Behandlung nur in 50% der Manipulationen zu einem vollständigen Verlust gekommen ist (Daten nicht gezeigt). Die restlichen 50% zeigten nur einen lokalen Verlust in den anterior gelegenen Skelettelementen. Dieser Unterschied in der Ausprägung der Effekte bei der MAB 304-Behandlung könnte in der Lage des Beads und der damit verbundenen Diffusionsweite des Antikörpers begründet sein. Ist der Bead eher zentral lokalisiert, kommt es zu einem vollständigen Verlust der Mineralisierung (Daten nicht gezeigt), ist er bei der Manipulation eher anterior gelegen, sind nur die anterior gelegenen Skelettstrukturen von dem Mineralisierungsverlust betroffen. Bei der Inhibition der AChE durch den BW-Inhibitor ist die Lage des Beads nicht so entscheidend wie bei MAB 304. Hier zeigten die BW-manipulierten Embryonen, dass auch anterior platzierte Beads zu einem vollständigen Verlust der Mineralisierung führen.

Desweiteren hat sich in der MAB 304-Versuchsreihe gezeigt, dass es bei der AChE-Inhibition *in vivo* von entscheidender Bedeutung ist, zu welchem Zeitpunkt der frühen Extremitätenentwicklung der Hemmstoff in die Extremität eingebracht wird. Die aussagekräftigsten Effekte traten in dieser Studie bei der Implantation der MAB 304-Beads im Stadium HH 18 auf. Manipulationen, die zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt (HH 22) durchgeführt wurden, zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Skelettentwicklung oder Mineralisierung.

In früheren Studien wurde bereits beschrieben, dass die Inhibition der AChE zu Veränderungen in der Knochenentwicklung führt. So wurden in einer Studie von Misawa et al. die Hinterextremitäten von Hühnerembryonen der Stadien HH 19/20 mit einer hohen Konzentration an Organophosphaten (200 µg/Ei Diazinon) behandelt, die daraufhin eine deutliche Verminderung des Knochenwachstums in Tibia und Metatarsale aufgezeigt haben (Misawa et al., 1982). Die Wirkungsweise der Organophosphate liegt dabei in der Inaktivierung der AChE durch die Phosphorylierung der Serin-Hydroxylgruppe an der katalytischen Bindedomäne der AChE. Die Inhibition der AChE scheint jedoch nicht nur

---

während der Embryonalentwicklung einen Einfluss auf die Skelettentwicklung zu haben, sondern auch in der Aufrechterhaltung des Knochenmetabolismus. Eine 1999 veröffentlichte medizinische Studie zeigt, dass Landarbeiter, die für den Insektenschutz große Mengen von Organophosphaten versprühten, und diese im Übermaß über die Haut aufgenommen haben, im Gegensatz zu gleichaltrigen Vergleichspersonen unter einer stark verminderten Knochendichte litten (Compston et al., 1999).

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bereits vorangegangene Aktivitätsstudien von Genever und Inkson gezeigt haben, dass die AChE auch in unterschiedlichen Osteoblasten-Zelllinien exprimiert wird (Genever et al., 1999; Inkson et al., 2004;). In der von Inkson et al. publizierten Studie konnte dies noch spezifiziert werden. Die Arbeitsgruppe zeigte mit Hilfe von Fluoreszenz-Analysen, dass die AChE in den Osteoblasten-Zelllinien mit dem Golgi-Apparat kolokalisiert ist. Darüber hinaus nimmt die AChE Aktivität während der Osteoblastendifferenzierung parallel zur ansteigenden alkalischen Phosphataseaktivität (ALP) zu. Die ALP spaltet dabei anorganisches Pyrophosphat und gewinnt so Phosphat für den Knochenaufbau. Gemeinsam mit Calcium wird daraus das Knochenmineral Hydroxylapatit generiert. Des Weiteren ist in dieser Studie eine mögliche Funktion der AChE in der Osteoblasten Adhäsion überprüft worden. Zu diesem Zweck wurden die Osteoblasten mit unterschiedlichen AChE-Inhibitoren behandelt und ihre Anhaftung an den Untergrund untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass es in den Osteoblasten-Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der adhäsiven Eigenschaften der Zellen kommt. Inkson et al. vermuteten daher aufgrund der durchgeführten Untersuchungen eine Funktion der AChE in der Vermittlung von adhäsiven Zell-Matrix Interaktionen im Knochen (Inkson et al., 2004).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der *in vivo* Manipulation, dass es aufgrund einer transienten Inhibition der AChE durch BW284c51 oder MAB 304 während der frühen Skelettentwicklung zu einem Verlust der Mineralisierung des Extremitätenknochens kommt. Auffällig ist hierbei, dass die Knorpelstrukturen in ihrer Ausbildung von dieser Inhibition unbeeinflusst bleiben. Da bei beiden verwendeten Hemmstoffen die gleichen Effekten auftreten, ist davon auszugehen, dass die Mineralsierung über die Zell-Adhäsionsdomäne des Enzyms reguliert wird und nicht über die enzymatische Aktivität. Dies würde für die bereits von Inkson et al., aufgestellte Vermutung sprechen, dass die AChE in den Osteoblasten eine Funktion in der Vermittlung von adhäsiven Zell-Matrix Interaktionen haben könnte.

---

### 4.3 Die Deletion der Cholinesterasegene führt zu einer Degradation der Knorpelmatrix und zur Runterregulation von chondrogenen Markern

---

In Ergänzung zu den Erkenntnissen aus den Inhibitionsversuchen im Tiermodell Huhn wurden zusätzlich drei genetisch veränderte Cholinesterase-Knockout-Mausmodelle ( $AChE^{-/-}/BChE^{wt}$ ,  $AChE^{wt}/BChE^{-/-}$ ,  $AChE^{-/-}/BChE^{-/-}$ ) zur näheren Untersuchung der Cholinesterasen während der embryonalen Skelettentwicklung *in vivo* herangezogen.

Eine erste phänotypische Gegenüberstellung der unterschiedlichen Knockoutmäuse im Vergleich zur Wildtypmaus zeigt, dass die Knockoutmäuse nur geringe morphologische Veränderungen aufweisen. Der deutlichste Unterschied zwischen den Mäusen zeigt sich im Entwicklungsstadium E13.5. In diesem Stadium sind die verschiedenen Knockoutmäuse allesamt größer und weiter entwickelt als die vergleichbare Wildtypmaus. Dieser optische Eindruck spiegelt sich auch in den Körpergewichten der Mäuse wieder. Auch hier zeigt sich, dass die Knockoutmäuse im Durchschnitt 5mal schwerer als die vergleichbare Wildtypmaus sind.

Zudem zeigen die BChE-Mutante und die Cholinesterase-Doppel-Knockoutmaus im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verfrühte Mineralisierung des primären Ossifikationszentrums. Das Fehlen der Cholinesterasen über den gesamten Entwicklungszeitraum führt in den frühen Stadien der Skelettentwicklung sowohl zu einer früher einsetzenden Chondrogenese als auch zu einer verfrühten Mineralisierung der Knorpelanlage. Ob es sich jedoch im Fall der Mausmutanten um eine echte Ossifikation durch Osteoblasten oder nur um eine sekundäre Kalzifizierung handelt konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher untersucht werden.

Studien von Walker et al. zeigen, dass bei einer Aktivierung des nAChR Rezeptors durch Nicotin in primären menschlichen Osteoblasten die Proliferation der Zellen erhöht wird und sie zusätzlich vermehrt c-fos und Osteopontin exprimieren (Walker et al., 2001). Beide Regulatoren fördern die Mineralisierung der Knochenmatrix. Bei Osteopontin handelt es sich um ein matrixbildendes Protein, welches in Osteoblasten für die Produktion von calciumbindenden Kristallen verantwortlich ist. C-fos ist ein Transkriptionsfaktor, der die alkalische Phosphatase-1 aktiviert und so die Mineralisierung der Knochenmatrix fördert. Zusätzlich besitzt c-fos auch die Fähigkeit, an das AChE-Gen zu binden und damit die Expression der AChE bei einem Überschuss von ACh und damit erhöhter Aktivierung des Rezeptors, über einen feed-back Loop hochzuregulieren (Walker et al., 2001). Überträgt man

---

die aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse auf den Phänotyp der Knockoutmäuse, so kann vermutet werden, dass es in diesen Mäusen durch die Deletion der Cholinesterasogene zu einer erhöhten extrazellulären ACh-Konzentration kommt, die über die Aktivierung des nAChRs ebenfalls die Proliferation in den Chondrozyten und Osteoblasten fördert. Dies würde dann auch die verfrühte Entwicklung der Skelettanlagen und Mineralisierung der Knochen erklären.

Vergleicht man die Skelettstrukturen der unterschiedlichen Cholinesterasemutanten mit der Wildtypmaus, so sind weitere Unterschiede zwischen ihnen zu erkennen. Ein erster direkter Vergleich der Knorpel- und Knochen-gefärbten Skelettstrukturen der Wildtypmaus mit dem Skelett der Cholinesterase-Doppelknockoutmaus im Stadium P0 zeigt, dass es aufgrund der Mutation in den Cholinesterasengen zu einer deutlichen Veränderung der Matrixdegradation in den unterschiedlichen Differenzierungstypen der Chondrozyten kommt. Vergleicht man jedoch den Kopf der Wildtypmaus mit dem der Doppelknockoutmaus, so fällt auf, dass es im Schädelbereich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Mäusen gibt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Mutation der Cholinesterasogene nur die Physiologie von Skelettstrukturen beeinträchtigt, die über die endochondrale Ossifikation gebildet werden. Die Schädelknochen, aber auch die Gesichtsknochen und das Schlüsselbein werden im Gegensatz zu den meisten anderen Skelettknochen nicht über die endochondrale Ossifikation, sondern mittels der desmalen Ossifikation gebildet. Bei dieser Verknöcherungsform differenzieren die mesenchymalen Vorläuferzellen direkt zu Osteoblasten und gehen nicht über einen mehrstufigen Prozess, bei dem die mesenchymalen Zellen erst kondensieren, dann in Chondrozyten differenzieren und eine Knorpelanlage als Grundlage für den späteren Knochen bilden.

Desweiteren fällt bei der Betrachtung der beiden Wholemound-Färbungen auf, dass die Ausprägung der Dislokalisierung der spezifischen Knorpelfärbung mittels Alcianblau einem spezifischen Gradienten zu folgen scheint. So nimmt in der Cholinesterase-Knockout-Maus die Degradation der sulfatreichen Proteoglykane der chondrogenen Bereiche im Achsenskelett, welches die Rippen und die Wirbelknochen beinhaltet, in caudaler Richtung zu. Dies führt dazu, dass die Vorderextremitäten der verschiedenen Individuen zu P0 teilweise noch eine unveränderte Knorpelmatrix aufweisen, während die Hinterextremitäten bereits eine vollständige Degradation der Knorpelmatrix in den Knochenköpfen zeigen. Im peripheren Skelett, welches die Knochen der Extremitäten und des Beckens umfasst, zeigt



---

sich dagegen, dass dieser Effekt in lateraler Richtung abnimmt und in den Fingerknochen teilweise eine unveränderte Darstellung der Knorpelmatrix erfolgt.

In den angefertigten Wholemout-Färbungen der Extremitätenknochen ist sowohl der eben beschriebene räumliche, als auch ein zeitlicher Gradient in der Gestaltung der durch die Cholinesterasemutation hervorgerufenen Defekte zu erkennen. Hierbei muss allerdings bei der Ausbildung der Knorpeldefekte zwischen den einzelnen Cholinesterasemutanten differenziert werden. So zeigt die BChE-Knockoutmaus im Gegensatz zur AChE-Mutante im Entwicklungsstadium E13.5 eine deutlich verfrühte Kalzifizierung des primären Ossifikationszentrums, was auch in der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus zu beobachten ist. Es lässt sich daher vermuten, dass die verfrühte Mineralisierung der Knochenmatrix über einen Mechanismus reguliert ist, der von der BChE abhängt. Die Degradation der Knorpelmatrix in den Cholinesterase-Knockout-Mäusen scheint einer noch unbekannten zeitabhängigen Regulation zu unterliegen. So zeigt sich zum Entwicklungsstadium P0 in allen Mausmutanten eine deutliche Degradation der Proteoglykane. Hierbei tritt auch wieder der bereits oben beschriebene räumliche Gradient auf. Während in der Hinterextremität fast ein vollständiger Abbau der Knorpelmatrix in den Epiphysen der Extremitätenknochen stattgefunden hat, findet sich zum Beispiel in der Vorderextremität der BChE-Knockout-Maus noch kein Anzeichen dieses Defektes.

Vergleicht man die einzelnen Gefrierschnitte zum Entwicklungsstadium P0, so lassen sich die Defekte in der Degradation der Knorpelmatrix spezifisch auf die Chondrozyten der Epiphyse beschränken. Die AChE- und BChE-Einzel-Knockout-Mäuse sind von diesem Defekt gleichermaßen betroffen. In beiden Mausmutanten lassen sich mit Alcianblau bei pH 2.5 keine spezifischen Knorpelproteine mehr in den ruhenden, den proliferierenden und den prähypertrophen Chondrozyten nachweisen. Lediglich die hypertrophen und terminalen hypertrophen Chondrozyten zeigen noch einen geringen Anteil an Proteoglykanen. Ein deutlicher Unterschied dazu zeigt sich in der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus. Hier sind zwar ebenfalls alle Chondrozyten, von den ruhenden bis zu den prähypertrophen Chondrozyten, vom Knorpelabbau betroffen. Allerdings findet sich im Knochenschaft ein stark erhöhter Proteoglykangehalt.

Um diese Beobachtung zusätzlich zu unterstützen, wurde ein weiterer Farbstoff gewählt, der ebenfalls hoch sensitiv unterschiedliche Gruppen knorpelspezifischer Proteoglykane anfärben kann. Die durchgeführte Toluidinfärbung zeigt in den Cholinesterasemutanten ebenfalls eine

---

Degradation der Proteoglykane in den Chondrozyten. Jedoch erkennt man hier, dass die damit markierten Gruppen von Proteoglykanen in der BChE-Mutante, verglichen mit der AChE-Mutante und der Doppel-Knockout-Maus, sehr viel weniger stark vom Knorpelabbau betroffen sind. Die beiden anderen Mausmutanten zeigen, wie auch schon in der Alcianblaufärbung gesehen, einen kompletten Abbau der Proteoglykane in den ruhenden, den proliferierenden, und den prähypertrophen Chondrozyten. Die hypertrophen und terminalen hypertrophen Chondrozyten sind wiederum nicht vom Matrixabbau betroffen. Anders als in der Alcianblaufärbung können mit Hilfe der Toluidinfärbung keine Proteoglykane im Knochenschaft der Cholinesterase-Doppel-Knockoutmaus nachgewiesen werden.

Die separierte Betrachtung der durchgeführten Alizarinrotfärbung an den Whollemounts der Extremitätenknochen der unterschiedlichen Mausmutanten zeigt, dass die Mineralisierung des primären Ossifikationszentrums, auch wenn sie in der BChE- und der Cholinesterase-Doppelknockout Maus bereits früher einsetzt, durch den Cholinesterase-Knockout sowohl in der desmalen Ossifikation als auch in der endochondralen Ossifikation nicht beeinträchtigt wird. Dieses Ergebnis ist nach den aus den Huhnmanipulationsexperimenten erhaltenen Daten und der Recherche einer Vielzahl an Studien ein eher unerwartetes Ergebnis. Studiert man jedoch die dazu veröffentlichten Daten eingehend, so lassen sich die durchgeführten Studien in zwei Gruppen einteilen. Zum einen gibt es die Studien, die aufgrund der Verwendung von spezifischen Cholinesteraseinhibitoren oder Organophosphaten Defekte in der Knochenmineralisierung beschrieben haben, und auf der anderen Seite gibt es die Studien, die aufgrund von Knockouts oder spezifischer Aktivierung von Cholinesteraserezeptoren Defekte in der Osteoblastendifferenzierung beschrieben haben. Beide Ansätze wurden auch im Verlauf dieser Doktorarbeit für die Untersuchung der Funktion der AChE in der Skelettentwicklung herangezogen. Bei der Auswertung der erhaltenen Ergebnisse scheint es jedoch, als ließen sich die beiden Untersuchungsmethoden nicht vergleichen, da sie auf unterschiedlichen bisher noch nicht bekannten Regulationsmechanismen zu basieren scheinen.

So zeigen Studien, in denen die AChE durch Organophosphate inhibiert wurde, eine Vielzahl schwerer Missbildungen in den Knorpel- und Knochenstrukturen und einen direkten Einfluss auf die Knochendichte (Misawa et al., 1982; Compston et al., 1999). Hierbei scheint es eine ko-Regulation zwischen der AChE Aktivität und der alkalischen Phosphatase Aktivität zu geben (Inkson et al., 2004). In der Medizin finden sich ebenfalls Stoffwechselerkrankungen,

---

bei denen es durch einen Mangel an Phosphatase zu einer ungenügenden Mineralisation der Knochen kommt (Orimo, 2010; Whyte, 2010). Diese Studien lassen deutliche Parallelen zu den aus den Beadexperimenten erhaltenen Daten erkennen.

Dagegen zeigen zum Beispiel die Studien von Walker et al., dass durch die direkte Aktivierung des nAChR die Mineralisierung des primären Ossifikationszentrums durch die vermehrte Expression von Osteopontin und c-fos positiv beeinflusst wird (Walker et al., 2001). Es ist anzunehmen, dass in den Knockoutmäusen durch die fehlenden Cholinesterasen der Acetylcholin Spiegel überdurchschnittlich hoch ist und dadurch eine vermehrte Aktivierung des nAChR erfolgt. Die transiente Inhibition der AChE durch die implantierten Beads in den *in ovo* Experimenten scheint nicht auszureichen, um die Aktivierung des nAChR soweit zu stimulieren, dass es zu ähnlichen Effekten in der Skelettentwicklung kommt. In zukünftigen Experimenten wäre es daher sehr interessant zu untersuchen inwiefern sich eine Blockade der AChRs auf die in der Knockout-Maus beobachteten Effekte auswirkt.

Um eine spezifische Aussage über die Anwesenheit und Verteilung der von der Mutation der Cholinesterasegene betroffenen Zellen in der Epiphyse treffen zu können, wurde mit Hilfe der Hämatoxylin/Eosin Übersichtsfärbung die Morphologie der charakteristischen Gliederung der Wachstumsfuge näher untersucht. In einer Detailaufnahme der Wachstumsfuge der Mausmutanten im Vergleich zur Wildtypmaus konnte gezeigt werden, dass die gesamte Gliederung der Zone der ruhenden, proliferierenden, prähypertrophen und hypertrophen Zellen in den Mausmutanten schrittweise verloren gegangen ist. Die Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus zeigt hierbei die geringste Veränderung in der Anordnung der Chondrozyten. Der Übergang von den proliferierenden zu den prähypertrophen Chondrozyten ist im Vergleich zur Wildtypmaus etwas unorganisierter und die säulenartige Gliederung der prähypertrophen Chondrozyten nicht so kompakt. In der BChE-Mutante fällt die klare Unterscheidung der einzelnen morphologisch charakteristischen Differenzierungsstadien der Chondrozyten nicht mehr so deutlich aus. Die Säulenstruktur der prähypertrophen Chondrozyten ist hier nur angedeutet erkennbar. In der AChE-Mutante lassen sich dagegen die proliferierenden Chondrozyten von den prähypertrophen Chondrozyten gar nicht mehr unterscheiden, sie scheinen in dieser Wachstumsfuge fließend ineinander überzugehen.

Eine deutliche Charakterisierung der von den unterschiedlichen Mutationen betroffenen Differenzierungstypen der Chondrozyten kann durch die Markierung spezifischer relevanter chondrogener und osteogener Marker der Skelettentwicklung mit Hilfe der *in situ*

---

Hybridisierungen gewährleistet werden. Hierfür wurden Sonden gegen die Transkripte von Kollagen Typ II, als Marker für proliferierende und prähypertrophe Chondrozyten, Indian Hedgehog (Ihh) als Marker für die prähypertrophen und die anfänglichen hypertrophen Chondrozyten, Kollagen Typ X und alkalische Phosphatase, als Marker für hypertrophe Chondrozyten und MMP-13 als Marker für terminale hypertrophe Chondrozyten und Osteoblasten verwendet.

Die Auswertung der *in situ* Hybridisierung zeigt deutlich, dass es in der AChE- und BChE-Mutante durch die Deletion der Cholinesterasegene zu P0 in den frühen proliferierenden Chondrozyten zu einem Verlust des Kollagen Typ II kommt. Die prähypertrophen Chondrozyten zeigen keine veränderte Expression. Im Gegensatz dazu zeigt jedoch die Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus eine zusätzliche Expression des Kollagen Typ II Gens im angrenzenden Periost. Die Ihh Expression ist jedoch in allen Mutanten stark gestört. In der AChE-Mutante konnte Indian Hedgehog zu P0 gar nicht mehr nachgewiesen werden, in den anderen beiden Mutanten konnten zumindest noch ein paar vereinzelte Zellen angefärbt werden. Die Expression des Kollagens X wird durch die Deletion der Cholinesterasegene ebenfalls stark gestört. Auch hier konnte in der AChE-Mutante keine Expression des Gens mehr nachgewiesen werden. Die anderen beiden Mutanten exprimieren Kollagen X weiterhin, die Zahl der positiven Zellen ist jedoch im Vergleich zur Wildtypmaus stark reduziert. Ein weiterer Marker der hypertrophen Chondrozyten ist die alkalische Phosphatase. Bei der Untersuchung der alkalischen Phosphatase-Aktivität fällt auf, dass in keiner der drei Mutanten die ALP zu P0 mehr nachgewiesen werden konnte. Allerdings lässt sich während der früheren Entwicklungsstadien E13.5 bis E18.5 in allen Cholinesterase-Mutanten eine deutliche ALP-Aktivität nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies erklärt unter anderem, dass es in der Kalzifizierung der Knochenmatrix, die zu einem Großteil von der alkalischen Phosphatase reguliert wird, zu keiner Ausbildung eines erkennbaren Phänotyps durch die Deletion der AChE- und BChE-Gene kommt.

Abschließend wurde noch die Expression von MMP-13, als Marker für terminalen hypertrophen Chondrozyten und die Osteoblasten untersucht. Hier zeigte sich in der *in situ* Hybridisierung, dass alle Mutanten eine deutliche Herunterregulation dieses Markers aufweisen. Während die BChE-Mutante lediglich eine verminderte Expression in den terminalen hypertrophen Chondrozyten und den Osteoblasten aufzeigte, konnten in der AChE-Mutante im Knochenschaft nur noch wenige MMP-13 positive Zellen im

---

Knochenschaft nachgewiesen werden. Die Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus zeigte ebenfalls eine deutliche Verminderung der MMP-13 Expression in den terminalen hypertrophen Chondrozyten, im Knochenschaft konnte sie allerdings nicht mehr nachgewiesen werden.

Zusammengenommen zeigt sich, dass die Deletion des AChE-Gens in der Mausmutante dazu führt, dass in der Epiphyse die charakteristische Gliederung der Chondrozyten stark gestört wird. Der Nachweis der charakteristischen Markergene für die Chondrozyten zeigt, dass es durch die Mutation zu einer Verminderung der frühen proliferierenden Chondrozyten kommt. Zu P0 lassen sich in dieser Mutante weder die späten prähypertrophen Chondrozyten, noch die frühen hypertrophen oder die terminalen hypertrophen Chondrozyten mittels ihrer spezifischen Marker mehr nachweisen. Lediglich die frühen prähypertrophen Chondrozyten scheinen von der Mutation unbeeinflusst zu sein.

In der BChE-Mutante zeigt sich ebenfalls eine starke Abnahme der Anzahl der differenzierten Chondrozyten in der Epiphyse. Zu P0 kann bereits ein Teil der frühen proliferierenden Chondrozyten nicht mehr nachgewiesen werden. Die späteren proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten sind dagegen in ihrer Anzahl im Vergleich zur Mausmutante kaum verändert. Erst die Differenzierung in die späten prähypertrophen und frühen hypertrophen Chondrozyten zeigt, wie durch Ihh gesehen, eine starke Verminderung der differenzierten Chondrozyten. Die terminalen hypertrophen Chondrozyten sind zwar im Vergleich zur Wildtypmaus ebenfalls vermindert, kommen jedoch noch in höherer Zahl vor, als die prähypertrophen und frühen hypertrophen Chondrozyten.

In der Cholinesterase-Doppel-Knockout-Maus zeigt sich ein ähnliches Expressionsmuster wie für die BChE-Mutante. Der Unterschied zwischen diesen beiden Mutanten liegt allerdings darin, dass in der Doppelmutante zusätzlich Zellen des Periost Marker für die proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimieren. Außerdem sind die frühen hypertrophen Chondrozyten und die terminalen hypertrophen Chondrozyten im Vergleich zur BChE-Mutante deutlich vermindert.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Kawakita et al. kann zeigen, dass die Expression von Kollagen Typ X, Ihh und die Aktivität der alkalischen Phosphatase durch die Aktivierung des nAChR negativ beeinflusst wird und es dabei zu einer konzentrationsabhängigen Degradation der Proteoglykanmatrix der Chondrozyten kommt (Kawakita et al., 2008; Sato et al., 2010). In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der nikotische Acetylcholinrezeptor in

---

E15.5 alten Mausembryonen in der Epiphyse der Extremitätenknochen in den ruhenden, den proliferierenden und den prähypertrophen, nicht aber in den hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird (Kawakita et al., 2008). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, warum die Proteoglykanmatrix der hypertrophen Chondrozyten in den Cholinesterase-Knockout-Mäusen diejenige ist, die von der Degradation unbeeinflusst geblieben ist.

Bisher gibt es noch keine Studie zur räumlichen und zeitlichen Expression des nAChRs über den gesamten Zeitraum der Skelettentwicklung von Mäusen hinweg. Darüber hinaus ist der Regulationsmechanismus, über den diese Veränderungen reguliert werden, bisher noch unklar. Der Verlauf der Matrixveränderung und die Ausbildung der Defekte in den Skelettstrukturen zu P0 lassen jedoch vermuten, dass die Rezeptoren zeitlich erst ab einem späteren Entwicklungszeitpunkt (nachgewiesen ab E15.5; Sato et al., 2010), und nicht mit Beginn der Chondrozytendifferenzierung exprimiert werden.

---

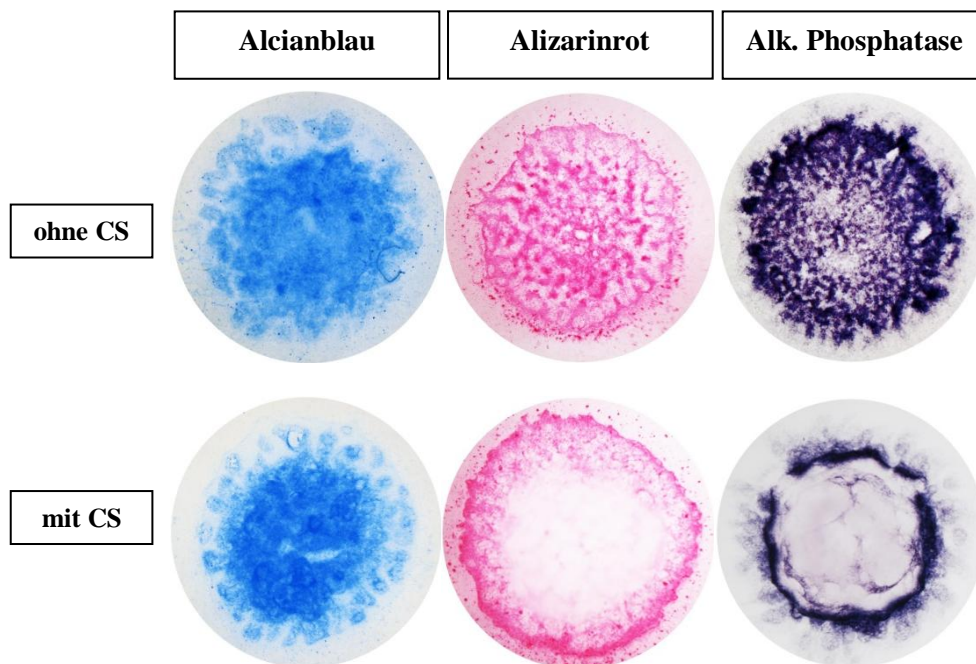
#### **4.4 Kultivierung der Micromass mit Hühnerserum beeinflusst die räumliche Trennung von Chondrozyten und „Osteoblasten“-ähnlichen Zellen**

---

In einem weiteren Versuch sollen die Erkenntnisse, die anhand der Cholinesterase-Knockoutmäuse über die Chondrogenese gewonnen wurden, näher beleuchtet werden. Hierzu werden die einzelnen Komponenten des nicht-neuronalen cholinergen Systems in der Regulation der Prozesse der Chondrogenese in der *in vitro* Micromasskultur differenziert betrachtet.

Bei der Micromasskultur handelt es sich um ein etabliertes *in vitro* Kultursystem, welches eines der wichtigsten Modellsysteme zur Analyse zellulärer und molekularer Prozesse der Chondrogenese darstellt. In der weiterentwickelten Langzeitkultivierung können neben der Chondrogenese auch Prozesse der Chondrozytenreifung, der Hypertrophie, der Kalzifizierung und der Apoptose spezifisch voneinander unterschieden werden (Mello und Tuan, 1999). In den bisher veröffentlichten Arbeiten, unter den darin beschriebenen Kulturbedingungen, treten die chondrogenen und kalzifizierten Zellen immer in identischen Bereichen kolokalisiert auf (Ulici et al., 2008). Um die Rolle des cholinergen Systems in der Skeletogenese besser untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit versucht die Kulturbedingungen soweit zu verändern, dass es möglich ist diese beiden Zelltypen auch räumlich voneinander getrennt näher zu untersuchen.

Seit vielen Jahren beschäftigt sich unser Labor mit der Aufklärung der regulatorischen Systeme der embryonalen Retinaschichtung. Als Versuchsmodell dient hierbei die Primärkultur der embryonalen Retinazellen in Form der Sphäroidkultur. In Anlehnung an das in dieser Kultur verwendete Differenzierungsmedium wurden den Micromasskulturen zusätzlich 2% Hühnerserum ins Differenzierungsmedium gegeben.



**Abbildung 40: Hühnerserum bewirkt eine räuml. Trennung von chondrogenen und kalzifizierten Zellen**

Die Zugabe von 2% Hühnerserum ins Differenzierungsmedium bewirkt eine räumliche Trennung der chondrogenen Proteoglykan-produzierenden Zellen (blau) und der Calcium-produzierenden Zellen (rot). Der Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität (lila) deutet eine räumliche Veränderung der Differenzierungsprozesse der chondrogenen Vorläuferzellen in „Osteoblasten“-ähnliche Zellen an.

Die Zugabe von 2% Hühnerserum (CS) ins Differenzierungsmedium führt zu einer deutlichen Veränderung der Lokalisation der chondrogenen und kalzifizierten Zellen. Während bei der Kultivierung ohne Hühnerserum die Proteoglykan-produzierenden Chondrozyten und kalzifizierten Zellen im gleichen Bereich kolokalisieren, kommt es bei der zusätzlichen Gabe von Hühnerserum ins Differenzierungsmedium zu einer räumlichen Trennung beider Zelltypen (siehe Abbildung 40).

Im Verlauf der späteren Knorpeldifferenzierung beginnen die prähypertrophen Chondrozyten in der Micromasskultur alkalische Phosphatase zu produzieren und unterstützen damit während der terminalen Knorpeldifferenzierung die Kalzifizierung der Micromasskultur (Seemann, 2006). Die Untersuchung der alkalischen Phosphatase Aktivität zeigt bei der Zugabe von CS ein deutlich verändertes Aktivitätsmuster. Die im Hühnerserum enthaltenen

---

Faktoren scheinen eine Trennung der Proteoglykan-produzierenden, der ALP-positiven und der kalzifizierten Zellen zu verursachen. Bezieht man die Erkenntnisse aus der Dissertation von P. Seemann mit ein, so scheint es zu einer räumlichen Trennung der einzelnen Differenzierungsstadien von den proliferierenden, über die prähypertrophen bis hin zu den terminalen hypertrophen Chondrozyten zu kommen.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss jedoch darauf geachtet werden, dass die *in vitro* Situation der Micromass in einigen Schritten stark von der *in vivo* Situation abweicht. *In vivo* differenzieren mesenchymale Zellen im Perichondrium in Knochenmatrix-produzierende Osteoblasten und bilden so das Periosteum, welches als dünne Knochenhaut den Knochen umgibt. In die Region des hypertrophen Knorpels wandern dann Blutgefäße aus dem Periosteum in die Knorpelanlage ein. Mit der Vaskularisierung gelangen auch Osteoblasten und Osteoklasten in die hypertrophe Region und beginnen den hypertrophen Knorpel durch Knochengewebe zu ersetzen. *In vitro* ist es jedoch nicht möglich aus den noch nicht differenzierten mesenchymalen Zellen der Kultur Osteoblasten zu differenzieren (Mello und Tuan, 1999; Ulici et al., 2008).

Es muss daher bei der Bewertung der Effekte die Kalzifizierung, also der Ansammlung von Calciumsalzen in Geweben, von einer „echten“ Ossifikation unterschieden werden (Boskey, 1998). Im Knochengewebe wird die Mineraleinlagerung von den knochenbildenden Zellen aktiv gesteuert. Diese Zellen produzieren zum einen Proteine, wie Kollagen Typ I und nichtkollagenöse Proteine (Bone-Sialoprotein, Osteopontin, Osteocalcin), die sowohl eine organische Matriz für die Mineraleinlagerung erzeugen, als auch die Entstehung und Ausrichtung der Hydroxylapatit-Kristalle bestimmen. Zum Anderen regulieren diese Zellen den Ionentransport und produzieren Enzyme, welche die Funktion der zuvor synthetisierten Proteine beeinflussen (Boskey, 1996; Boskey, 1998). Ist die Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{P}_i$  im extrazellulären Raum jedoch zu hoch und der Gehalt der regulatorischen Proteine nicht ausreichend, verläuft die initiierte Mineralisierung unkontrolliert weiter. Ist die Konzentration eines der beteiligten Ionen dagegen zu niedrig, findet eine Mineraleinlagerung deutlich langsamer oder gar nicht mehr statt (Majore, 2005).

Bezieht man diese Erkenntnisse auf die in der Micromass erhaltenen Beobachtungen, so ist es möglich, dass es sich bei der nachgewiesenen Alizarinrotfärbung nicht um eine „echte“ Ossifikation handelt, die durch die Differenzierung von „Osteoblasten“-ähnlichen Zellen initiiert wird. Viel mehr könnte es eine Kalzifizierung sein, die durch einen Überschuss an



---

$\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{P}_i$  im Medium, den fehlenden Osteoblasten und deren sezernierten regulatorischen Proteinen initiiert wird. Um feststellen zu können, ob die Mineralisierung auf einer Ossifikation oder einer Kalzifizierung zurückzuführen ist, müssten zum einen spezifisch Osteoblasten oder deren regulatorische Proteine in der Kultur nachgewiesen werden, und zum anderen der zeitliche Abstand zwischen der Ausbildung der Osteoblasten und dem Beginn der Mineraleinlagerung ermittelt werden.

Interpretiert man die durchgeführte Alizarinrotfärbung hinsichtlich einer „echten“ Ossifikation, so stellt dieses veränderte Kultursystem eine Bestätigung der von Roach et al. aufgestellten Hypothese dar. Diese sagt aus, dass die chondrogenen Zellen im letzten Schritt ihrer hypertrophen Differenzierung in der Lage sind eine asymmetrische Zellteilung durchzuführen, aus der sowohl eine Tochterzelle durch Apoptose eliminiert, als auch eine andere osteogene Zelle differenziert wird (Roach et al., 1995; vergleiche Hypothese S. 19). Für diese Hypothese spricht auch die Beobachtung, dass die terminalen Chondrozyten zwischen der Alcianblaufärbung und der Alizarinrotfärbung einen definierten Bereich mit einer ALP Färbung ausbilden. Dieses Enzym stellt einen typischen Osteoblasten-Marker dar und unterstützt die Vermutung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Desweiteren wurde in diesem Kultursystem eine Apoptosefärbung durchgeführt, die gezeigt hat, dass es im Bereich der ALP-positiven Zellen vermehrt zu einer definierten Ansammlung apoptotischer Zellen kommt (Daten nicht gezeigt). Auch dies spricht für das theoretische Modell einer asymmetrischen Zellteilung der terminalen Chondrozyten von Roach et al.

Für eine genauere Aussage zur Lokalisation der chondrogenen Differenzierungsstadien müssten jedoch noch in zukünftigen Untersuchungen die Expressionen der spezifischen chondrogenen Marker wie zum Beispiel Kollagen II (proliferierende Chondrozyten), Ihh (prähypertrophe Chondrozyten), Kollagen X und MMP-13 (hypertrophe Chondrozyten) überprüft werden. Welche Faktoren aus dem Hühnerserum im speziellen für diese räumliche Trennung der beiden Zelltypen verantwortlich sind, oder auf welche Migrations- oder Differenzierungsprozesse diese Veränderung zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht ermittelt werden. Da das Hauptaugenmerk dieser Studie nicht darauf ausgerichtet war zu beweisen, dass Chondrozyten in ihrer terminalen Differenzierung einen asymmetrischen Differenzierungsweg bestreiten, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auch keine weiteren Versuchen in diese Richtung durchgeführt. Es bietet sich jedoch an, das

---

neu entwickelte Kultursystem zu nutzen, um dieses theoretische Modell in späteren Arbeiten noch differenzierter zu untersuchen.

---

#### **4.5 Die Knorpeldegradation in der Chondrogenese wird über das nicht-neuronale cholinerge System reguliert**

---

Die so veränderte Kultivierung der Micromass dient ihm Folgenden als Grundlage für die Untersuchung des nicht-neuronalen cholinergen Systems. Hierbei wird die Chondrozytendifferenzierung unter anderem während der AChE-Inhibition, der Nikotinapplikation und der Hemmung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors näher untersucht.

Die Auswertung der histologischen Färbungen zeigt in diesen Versuchen deutlich, dass sowohl die AChE-Inhibition als auch die Nikotinapplikation zu einer konzentrationsabhängigen Degradation der Knorpelmatrix und zu einer Inhibition der ALP-Aktivität führt.

Die bisher angeführten Studien zum Einfluss der AChE auf die Chondro- und Osteogenese zeigen, dass die Regulation vieler spezifischer Matrixproteine und die alkalische Phosphataseaktivität über cholinerge Rezeptoren vermittelt werden. Betrachtet man die dazu bisher veröffentlichten Expressionsstudien zu den cholinergen Rezeptoren während der Knochenentwicklung, so ist zu erkennen, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren sowohl in allen Stadien der Chondrozytendifferenzierung (Lind et al., 1998; Kawakita et al., 2008) als auch den Osteoblasten (En-Nosse et al., 2009, Sato et al., 2010; Liu et al., 2011) exprimiert werden. In einer Studie von Kawakita et al. konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Aktivierung des  $\alpha 7$  nAChRs die Matrixsynthese von Kollagen X und Glykosaminoglykanen in den Chondrozyten vermindert und die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten unterdrückt wird (Kawakita et al., 2008). Der dieser Regulation zugrunde liegende Mechanismus konnte bisher jedoch noch nicht geklärt werden.

In der klassischen Regulation des cholinergen Systems führt eine Inhibition der AChE, aufgrund der nicht mehr stattfindenden Degradation des Acetylcholins, zwangsläufig zu einem Anstieg des Acetylcholinspiegels. Diese Regulation scheint auch im verwendeten Micromass stattzufinden. Das würde erklären, dass sowohl Nikotin als auch der verabreichte AChE-Inhibitor BW284c51 zu den gleichen Defekten führt. Aus den bereits veröffentlichten Studien lässt sich die Vermutung anstellen, dass in beiden Fällen die beobachteten Effekte

---

schlussendlich auf die Aktivierung des Acetylcholinrezeptors zurückzuführen sind. Da in den angegebenen Studien immer wieder der nikotinische Rezeptor als Zielrezeptor angegeben wird, soll in einem weiteren Versuch überprüft werden, ob auch in dem von mir verwendeten Kultursystem eine Regulation über diesen Rezeptor erfolgt. Aus diesem Grund wird zusätzlich zur Nikotinbehandlung der  $\alpha 7$  nAChR spezifisch mit Hilfe von MLA in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe inhibiert. Hierbei kann beobachtet werden, dass die Nikotin-bedingte Knorpeldegradation und Inhibition der ALP Aktivität mit ansteigender MLA Konzentration vermindert werden kann. Dies bestätigt die bereits vorangegangenen Beobachtungen, dass ACh bzw. Nikotin in den Chondrozyten über den nAChR agiert.

Zusammengenommen zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass die frühen Stadien der Chondrogenese über eine feine Regulation der ACh- und AChE Konzentration und der damit verbundenen Aktivierung des nAChR reguliert werden. Ein dazu aufgestelltes theoretisches Modell wird im folgenden Kapitel näher besprochen.

Betrachtet man nun rückwirkend die erworbenen Daten aus der *in vivo* Manipulation im Huhn mit den Knockout-Daten aus den Mausmutanten oder den *in vitro* Ergebnissen aus der Micromasskultur so scheinen die Ergebnisse auf dem ersten Blick sehr widersprüchlich zu sein. So kommt es im Manipulationsversuch des Huhns durch die AChE-Inhibition zu einem deutlichen Verlust der Knochenmineralisierung, während der Knockout der Cholinesterasen in der Maus keine Veränderung in der Knochenmineralisierung verursacht sondern vielmehr die Prozesse der Chondrogenese stört. Die Ursache für diese beiden sehr unterschiedlichen Effekte scheint in der Durchführung der Experimente selbst zu liegen. Während *in vivo* die AChE-Inhibition mit Hilfe der Beads nur über einen kurzen Zeitraum der Skelettentwicklung hinweg stattfindet, wird die AChE in den Knockoutmäusen und in der *in vitro* Kultur über den gesamten Entwicklungszeitraum hinweg konstant inhibiert. Viele regulatorische Proteine der Chondrogenese und Osteogenese unterliegen einem strikten räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster. Dies wurde auch in den Manipulationsexperimenten deutlich. Während die AChE-Inhibition mit dem AChE-Antikörper MAB 304 bei HH 18 zu einer Verminderung der Matrixmineralisierung führt, zeigen die zu einem späteren Stadium manipulierten Embryonen keinen Effekt in der Matrixmineralisierung.

Eine weitere Erklärung könnte auch in den zugrundeliegenden Regulationsmechanismen der Chondrogenese und Osteogenese liegen. Während bisher veröffentlichte Studien zu der Bedeutung der AChE in Osteoblasten-Zelllinien überwiegend eine Funktion der AChE in

---

seiner Fähigkeit als Zelladhäsionsmolekül sehen (Genever et al., 1999; Inkson et al., 2004), scheint die Rolle in der Chondrogenese über das nicht-neuronale cholinerge System und damit über die Enzymaktivität der AChE reguliert zu sein.

---

#### **4.6 Modell zur Regulation der Chondrogenese durch den ACh/AChE Feedback-Loop**

---

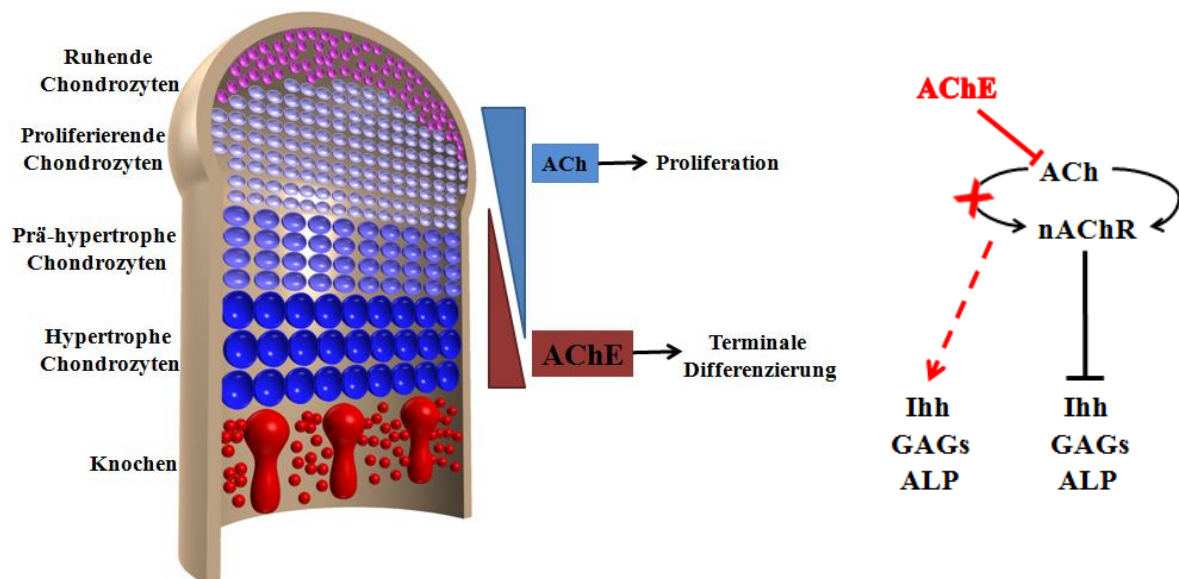
Die im Laufe dieser Doktorarbeit zusammengetragenen Daten zeigen, dass das nicht-neuronale cholinerge System eine entscheidende Rolle in der Regulation chondrogener Gene wie *Ihh*, Kollagen Typ X, MMP-13 und ALP zu haben scheint. In diesem Abschnitt soll mit Hilfe der aktuell zu diesem Thema veröffentlichten Studien eine mögliche Regulation dieses Systems während der frühen embryonalen Skelettentwicklung besprochen werden.

Während der Chondrogenese bestimmt eine Vielzahl zentraler Regulationsmechanismen über das Schicksal der proliferierenden und differenzierenden Chondrozyten. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Studie von En-Nosse et al., in der gezeigt werden kann, dass während der Chondrozytendifferenzierung viele Komponenten des cholinergen Systems wie zum Beispiel Acetylcholin, nAChR, ChAT und VACHT durch BMP hochreguliert werden (López-Coviella et al., 2002; Berse et al., 2005; En-Nosse et al., 2009). Darüber hinaus konnte bereits in murinen und humanen Chondrozyten der Epiphyse *in vivo* der nAChR nachgewiesen werden (Kawakita et al., 2008). Auffällig ist hierbei jedoch die Tatsache, dass dieser Rezeptor nur in den ruhenden, den proliferierenden und den prähypertrophen, nicht aber in den hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird (siehe Abbildung 41). Weitere *in vivo* und *in vitro* Studien können zeigen, dass die nAChR und mAChR auch in Osteoblasten exprimiert werden und dort bei Aktivierung durch Acetylcholin die Proliferation der Zellen fördern (En-Nosse et al., 2009; Sato et al., 2010). Über einen bisher noch nicht ermittelten Regulationsmechanismus heraus beginnen die Zellen in der hypertrophen Zone der Epiphyse AChE zu exprimieren (Vogel-Höpker et al., 2010).

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des nAChR direkt durch Nikotingabe oder indirekt durch die AChE-Inhibition zu einer verminderten ALP-Aktivität und zu einer Knorpeldegradation führt. Die Beobachtungen aus den Knockoutmäusen zeigen zudem, dass auch *Ihh* und MMP-13, zwei weitere wichtige Regulatoren der Chondrogenese durch das Fehlen der AChE herunterreguliert werden. Dies konnte durch die Studie von Kawakita et al. ebenfalls bestätigt werden (Kawakita et al., 2008). Eine Erklärung oder ein

dem zugrundeliegenden Regulationsmechanismus konnte bisher jedoch noch nicht gegeben werden.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Differenzierung der Chondrozyten ähnlich wie in der Ihh/PTHrP-Rückkopplungsschleife über eine feine Regulation des nicht-neuronalen cholinergen Systems erfolgt.



**Abbildung 41: Modell für die cholinerge Regulation der Chondrozytendifferenzierung und Hypertrophie**

Dargestellt ist die in die mögliche nicht-neuronale cholinerge Regulation der Chondrozytendifferenzierung und Hypertrophie. Die ruhenden, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimieren den nikotischen AChR. Über das im Perichondrium exprimierte BMP wird in den Chondrozyten die Synthese von ACh stimuliert. In den Chondrozyten, in denen ACh den nAChR aktivieren kann, werden die chondrogenen Marker Kollagen Typ X, MMP-13 und ALP inhibiert und die Proliferation der Zellen gefördert. Das von den hypertrophen Chondrozyten sekretierte AChE diffundiert in die chondrogene Zone und spaltet dort das ACh und vermindert damit die Aktivierung des nAChR. Die Hemmung der Kollagen Typ X, MMP-13 und ALP-Expression wird aufgehoben und die Chondrozyten werden in die Lage versetzt zu differenzieren bzw. zu hypertrophieren. Im Verlauf dieser Differenzierung verlieren diese Chondrozyten zusätzlich ihre nAChRs.

Für diese Regulation ist das Zusammenspiel von Acetylcholin, der Acetylcholinesterase und dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor von entscheidender Bedeutung. Während die Chondrozyten in ihrer proliferativen Phase gehalten werden, wird von ihnen das ACh und der nAChR in hohen Mengen produziert. Aus den *in vitro* Daten ist bereits bekannt, dass diese Rezeptoraktivierung die hypertrophe Differenzierung und damit die Expression typischer chondrogenener Marker hemmt. Demgegenüber stehen die hypertrophen Zellen, die vermehrt beginnen AChE zu sekretieren. Die AChE diffundiert langsam in die chondrogene Zone ein und bewirkt dort eine Abnahme des ACh-Spiegels und vermindert so indirekt die Aktivierung des nAChRs. Durch diesen Prozess werden die Chondrozyten langsam aus ihrem proliferativen Stadium entlassen und in die Lage versetzt, chondrogene

---

Differenzierungsmarker wie Ihh, MMP-13 oder ALP zu exprimieren. Im Verlauf dieser Differenzierung verlieren die Chondrozyten zusätzlich ihre nAChRs, womit sie vollständig in die Lage versetzt werden zu differenzieren bzw. hypertrophieren.

Für die Validierung dieses theoretischen Modells ist es jedoch notwendig in späteren Arbeiten alle dafür verantwortlichen Komponenten des cholinergen Systems noch einmal geschlossen in einem Tiermodell nachzuweisen. Zudem bietet es sich an die frühe Skeletogenese zusätzlich auch in den  $\alpha 7$ -nAChR Knockoutmäusen noch einmal genauer zu betrachten, da hier die regulatorische Hauptkomponente des nicht-neuronalen cholinergen Systems nicht mehr exprimiert wird. Dieses Tiermodell wird bisher vor allem für die Untersuchung pathologischer, arthritischer Prozesse aber nicht für die Untersuchung der Skeletogenese herangezogen.

---

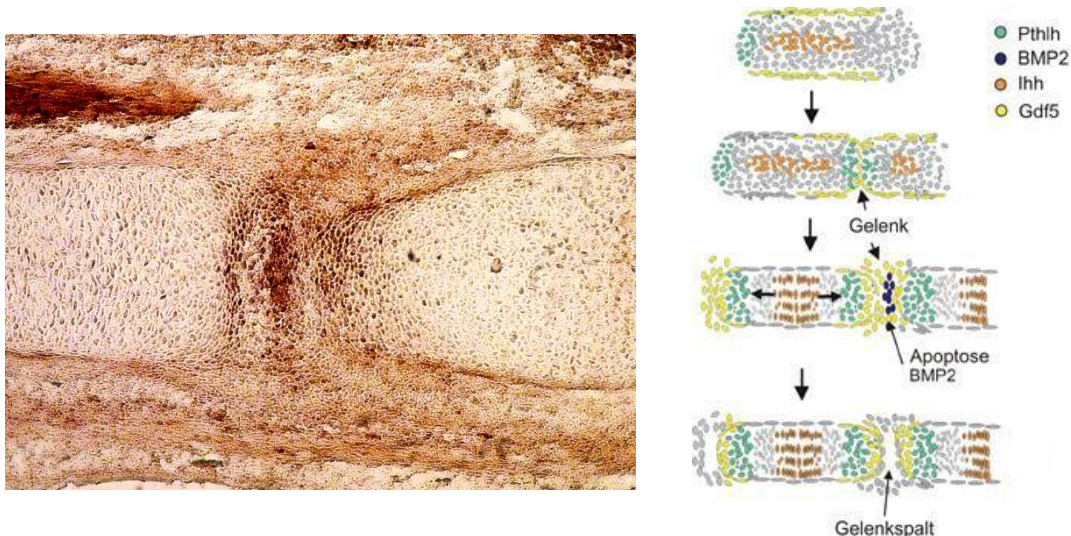
#### **4.7 Rolle der AChE in der Apotoseregulation der frühembryonalen Knorpelanlagen, der Gelenkregionen und der Zwischenfingerbereiche**

---

Im Verlauf dieser Doktorarbeit ist noch eine weitere Beteiligung der AChE in der Regulation der Extremitätenentwicklung sichtbar geworden. Betrachtet man die Gefrierschnitte der späteren Stadien der embryonalen Extremitätenentwicklung etwas genauer, so können zwei weitere, sehr interessante Aktivitätsmuster der AChE beschrieben werden. Besonders auffällig ist hierbei, dass während die AChE Aktivität in den differenzierten Chondrozyten nicht mehr nachgewiesen werden kann, sie in den Bereichen der Gelenke wieder stark hochreguliert ist. An der Stelle des zukünftigen Gelenkes kommt es zunächst zu einer Kondensation von Knorpelzellen, die sich zunehmend in lang gestreckte Fibroblasten verwandeln. In dieser auch als Interzone bezeichneten Region wird der zukünftige Gelenkspalt entstehen. Im weiteren Verlauf reduziert sich die Zahl der hypoplastären Zellen in der Mitte der Interzone durch Zelltod und Migration wieder. Es entsteht der Gelenkspalt, der sich im weiteren Verlauf immer weiter ausbildet und parallel zur Gelenkkapsel entwickelt.

Vergleicht man die AChE Aktivität in dem entstehenden Gelenk mit einer schematischen Abbildung der an der Gelenkentwicklung beteiligten Regulationsfaktoren, so lassen sich Parallelen zwischen der Expression einzelner Faktoren und der AChE Aktivität finden. So scheint die vermehrte AChE Expression in der Interzone des Gelenkes mit dem Bereich zu korrelieren in dem auch eine vermehrte BMP2-Expression und schließlich die Apoptose lokalisiert ist. Die beiden angrenzenden AChE-Banden an den Knochenenden zeigen dagegen eine Übereinstimmung mit den Bereichen in denen die an der Gelenkentstehung beteiligten

Zellen vermehrt Pthlh exprimieren. Pthlh gehört zu den PTH-like Peptiden, die in den periartikulären Chondrozyten exprimiert werden und über einen negativen Feedback-Loop mit Ihh an der Regulation des Wachstums und der Differenzierung der Chondrozyten beteiligt ist.



**Abbildung 42: Schematischer Ablauf einer embryonalen Gelenkentwicklung**

In der Abbildung ist die AChE-Aktivität in der Gelenkregion zwischen zwei Fingergliedern der Hinterextremität von Hühnerembryonen HH 34 dargestellt. Quelle Schemabild: MPI mol. Genetik/Mundlos (Seemann et al., 2005)

Die zweite auffällige AChE Aktivität findet sich in den Embryonalstadien HH 28-30 in den Zwischenfingerbereichen der frühen Hühnerextremität. Hier tritt die AChE Aktivität vermehrt ab HH 28 auf und bleibt bis zum vollständigen Abbau der Zwischenfingerewebe in diesem Bereich exprimiert. Vergleicht man die Erkenntnisse der Gelenkbildung mit dem Abbau der Zwischenfingerbereiche, so fällt auf, dass die Aktivität der AChE in beiden Geweben mit den Orten der Apoptose korreliert. Wie in der oberen Abbildung (siehe Abbildung 42) bereits schematisch angedeutet ist, zeigen eine Vielzahl unterschiedlicher Studien, dass BMP2 und -4 einen entscheidenden Einfluss auf die Apoptoseregulation in den Zwischenfingerbereichen und der Gelenkbildung von Huhn und Maus haben (Yokouchi et al., 1996; Gilbert SF., 2000; Gofflot et al., 2003). Darüber hinaus stieg in den letzten Jahren die Anzahl der Studien, die einen regulatorischen Einfluss der AChE auf die Apoptoseregulation vermuten, stark an (Zhang et al., 2002; Park et al., 2004; Jiang et al., 2008). So berichtet die Arbeitsgruppe von Hyun et al., dass die AChE eine direkte Induktion der Apoptoseregulation durch die Aktivierung von Apaf-1 veranlassen kann (Park et al., 2004).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Expressionsstudie, dass in späteren Entwicklungsstadien die AChE Aktivität sowohl in den entstehenden Gelenkbereichen als



auch in den apoptotischen Zwischenfingerbereichen mit dem Vorkommen von BMP-2 und -4 zu korrelieren scheint.



---

## 5 Literaturverzeichnis

---

- Adams JC, Watt FM. *Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix*. Development. Apr;117(4):1183-98., 1993.
- Ahrens PB, Solursh M, Reiter RS. *Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture*. Dev Biol. Oct 1;60(1):69-82., 1977.
- Akisaka T, Gay CV. *Ultrastructural localization of calcium-activated adenosine triphosphatase (Ca<sup>2+</sup>-ATPase) in growth-plate cartilage*. J Histochem Cytochem. Sep;33(9):925-32., 1985.
- Alber R, Sporns O, Weikert T, Willbold E, Layer PG. *Cholinesterases and peanut agglutinin binding related to cell proliferation and axonal growth in embryonic chick limbs*. Anat Embryol (Berl). Nov;190(5):429-38., 1994.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, und K. und Watson, JD. Roberts. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 1489 - 1535, 1997.
- Ali SY, Sajdera SW, Anderson HC. *Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage*. Proc Natl Acad Sci U S A. Nov;67(3):1513-20., 1970.
- Allain TJ, McGregor AM. *Thyroid hormones and bone*. J Endocrinol. Oct;139(1):9-18., 1993.
- Anderson HC, Garimella R, Tague SE. *The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization*. Front Biosci. Jan 1;10:822-37. Print 2005 Jan 1., 2005.
- Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, Dhanyamraju R, Atti E, Camacho NP, Millán JL. *Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice*. Am J Pathol. Mar;164(3):841-7., 2004.
- Anderson. *Matrix vesicles and calcification*. Curr Rheumatol Rep. Jun;5(3):222-6., 2003.
- Anderson. *Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage*. J Cell Biol. Apr;41(1):59-72., 1969.
- Aszodi A, Hunziker EB, Brakebusch C, Fässler R. *Betal integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis*. Genes Dev. Oct 1;17(19):2465-79., 2003.
- Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. *TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases*. Dev Biol. Aug;158(2):414-29., 1993.
- Bang OS, Kim EJ, Chung JG, Lee SR, Park TK, Kang SS. *Association of focal adhesion kinase with fibronectin and paxillin is required for precartilaginous condensation of chick mesenchymal cells*. Biochem Biophys Res Commun. Nov 30;278(3):522-9., 2000.
- Bates GP, Schor SL, Grant ME. *A comparison of the effects of different substrata on chondrocyte morphology and the synthesis of collagen types IX and X*. In Vitro Cell Dev Biol. May;23(5):374-80., 1987.
- Berse B, Szczecinska W, Lopez-Coviella I, Madziar B, Zemelko V, Kaminski R, Kozar K, Lips KS, Pfeil U, Blusztajn JK. *Expression of high affinity choline transporter during mouse development in vivo and its upregulation by NGF and BMP-4 in vitro*. Brain Res Dev Brain Res. Jun 30;157(2):132-40., 2005.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. *Sox9 is required for cartilage formation*. Nat Genet. May;22(1):85-9., 1999.
-

- 
- Bianco P, Cancedda FD, Riminucci M, Cancedda R. *Bone formation via cartilage models: the "borderline" chondrocyte*. Matrix Biol. Jul;17(3):185-92., 1998.
- Böhme K, Li Y, Oh PS, Olsen BR. *Primary structure of the long and short splice variants of mouse collagen XII and their tissue-specific expression during embryonic development*. Dev Dyn. Dec;204(4):432-45., 1995.
- Boskey. *Biom mineralization: conflicts, challenges, and opportunities*. J Cell Biochem Suppl.;30-31:83-91., 1998.
- Boskey. *Matrix proteins and mineralization: an overview*. Connect Tissue Res.;35(1-4):357-63., 1996.
- Bourne Y, Taylor P, Bougis PE, Marchot P. *Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. A peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly*. J Biol Chem. Jan 29;274(5):2963-70., 1999.
- Bourne Y, Taylor P, Radić Z, Marchot P. *Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site*. EMBO J. Jan 2;22(1):1-12., 2003.
- Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, Aszódi A, Bengtsson T, Berna A, Fässler R. *Functional consequences of integrin gene mutations in mice*. Circ Res. Aug 3;89(3):211-23., 2001.
- Broulik PD, Jaráb J. *The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice*. Horm Metab Res. Apr;25(4):219-21., 1993.
- Buerkle H, Boschini M, Marcus MA, Brodner G, Wüsten R, Van Aken H. *Central and peripheral analgesia mediated by the acetylcholinesterase-inhibitor neostigmine in the rat inflamed knee joint model*. Anesth Analg. May;86(5):1027-32., 1998.
- Burgeson RE, Nimni ME. *Collagen types. Molecular structure and tissue distribution*. Clin Orthop Relat Res. Sep;(282):250-72., 1992.
- Camper L, Hellman U, Lundgren-Akerlund E. *Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit  $\alpha 10$ , a  $\beta 1$ -associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes*. J Biol Chem. Aug 7;273(32):20383-9., 1998.
- Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B, Quarto R. *Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis*. Int J Dev Biol.;44(6):707-14., 2000.
- Castagnola P, Dozin B, Moro G, Cancedda R. *Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro*. J Cell Biol. Feb;106(2):461-7., 1988.
- Chan GK, Duque G. *Age-related bone loss: old bone, new facts*. Gerontology. Mar-Apr;48(2):62-71., 2002.
- Chatonnet A, Lockridge O. *Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*. Biochem J. Jun 15;260(3):625-34., 1989.
- Cheung JO, Grant ME, Jones CJ, Hoyland JA, Freemont AJ, Hillarby MC. *Apoptosis of terminal hypertrophic chondrocytes in an in vitro model of endochondral ossification*. J Pathol. Nov;201(3):496-503., 2003.
- Chung UI, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. *Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development*. J Clin Invest. Feb;107(3):295-304., 2001.
- Coelho CN, Koshier RA. *Gap junctional communication during limb cartilage differentiation*. Dev Biol. Mar;144(1):47-53., 1991 .
- Cohn MJ, Tickle C. *Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan*. Trends Genet. Jul;12(7):253-7., 1996 .
-

- 
- Colnot C, Lu C, Hu D, Helms JA. *Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development*. Dev Biol. May 1;269(1):55-69., 2004.
- Colnot. *Cellular and molecular interactions regulating skeletogenesis*. J Cell Biochem. Jul 1;95(4):688-97., 2005.
- Colnot CI, Helms JA. *A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development*. Mech Dev. Feb;100(2):245-50., 2001.
- Compston JE, Vedi S, Stephen AB, Bord S, Lyons AR, Hodges SJ, Scammell BE. *Reduced bone formation after exposure to organophosphates*. Lancet. Nov 20;354(9192):1791-2., 1999.
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, et al. *Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning*. Nature. Feb 3;367(6462):455-9., 1994.
- Dahl. *A simple and sensitive histochemical method for calcium*. Proc Soc Exp Biol Med. Jul;80(3):474-9., 1952.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. *Neurobiology of butyrylcholinesterase*. Nat Rev Neurosci. Feb;4(2):131-8., 2003.
- De Arcangelis A, Mark M, Kreidberg J, Sorokin L, Georges-Labouesse E. *Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse*. Development. Sep;126(17):3957-68., 1999.
- de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. *Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation*. Matrix Biol. Sep;19(5):389-94., 2000.
- Deal. *Osteoporosis: prevention, diagnosis, and management*. Am J Med. Jan 27;102(1A):35S-39S., 1997.
- Dean DD, Schwartz Z, Muniz OE, Gomez R, Swain LD, Howell DS, Boyan BD. *Matrix vesicles are enriched in metalloproteinases that degrade proteoglycans*. Calcif Tissue Int. Apr;50(4):342-9., 1992a.
- Dean DD, Schwartz ZV, Muniz OE, Gomez R, Swain LD, Howell DS, Boyan BD. *Matrix vesicles contain metalloproteinases that degrade proteoglycans*. Bone Miner. May;17(2):172-6., 1992b.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. *Cellular interactions and signaling in cartilage development*. Osteoarthritis Cartilage. Sep;8(5):309-34., 2000.
- Deprez PN, Inestrosa NC. *Two heparin-binding domains are present on the collagenic tail of asymmetric acetylcholinesterase*. J Biol Chem. May 12;270(19):11043-6., 1995.
- Derynck R, Zhang YE. *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature. Oct 9;425(6958):577-84., 2003.
- Dessau W, von der Mark H, von der Mark K, Fischer S. *Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis*. J Embryol Exp Morphol. Jun;57:51-60., 1980.
- Detlev Ganten, Klaus Ruckpaul. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*. Springer-Verlag, 2006.
- Drenckhahn D., Benninghoff A. *Muskelgewebe. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, 16. Auflage. Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. Urban & Fischer München jena, 149-170., 2003.
- Drews, Drews. *Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchens*. Springer Verlag, Wilhelm Roux' Archiv 169, 70-86, 1972.
-

---

Drews, Drews. *Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchens. II. Fermentaktivität und Bewegungsverhalten der präsumptiven Knorpelzellen in vitro*. Springer Verlag, Wilhelm Roux' Archiv 173, 208-227, 1973.

Drissi MH, Li X, Sheu TJ, Zuscik MJ, Schwarz EM, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. *Runx2/Cbfa1 stimulation by retinoic acid is potentiated by BMP2 signaling through interaction with Smad1 on the collagen X promoter in chondrocytes*. J Cell Biochem. Dec 15;90(6):1287-98., 2003.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell. May 30;89(5):747-54., 1997.

Duysen EG, Stribley JA, Fry DL, Hinrichs SH, Lockridge O. *Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse*. Brain Res Dev Brain Res. Jul 30;137(1):43-54., 2002.

Eichler J, Anselment A, Sussman JL, Massoulié J, Silman I. *Differential effects of "peripheral" site ligands on Torpedo and chicken acetylcholinesterase*. Mol Pharmacol. Feb;45(2):335-40., 1994.

En-Nosse M, Hartmann S, Trinkaus K, Alt V, Stigler B, Heiss C, Kilian O, Schnettler R, Lips KS. *Expression of non-neuronal cholinergic system in osteoblast-like cells and its involvement in osteogenesis*. Cell Tissue Res. Nov;338(2):203-15., 2009.

Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. *Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation*. J Biol Chem. Mar 24;275(12):8695-702., 2000.

Enomoto M, Leboy PS, Menko AS, Boettiger D. *Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin*. Exp Cell Res. Apr;205(2):276-85., 1993.

Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nakashima K, Mukudai Y, Boettiger D, Pacifici M, Kurisu K, Suzuki F. *Involvement of alpha5beta1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes*. J Bone Miner Res. Jul;12(7):1124-32., 1997.

Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. *Toward a molecular understanding of skeletal development*. Cell. Feb 10;80(3):371-8., 1995.

Falugi C, Raineri M. *Acetylcholinesterase (AChE) and pseudocholinesterase (BuChE) activity distribution pattern in early developing chick limbs*. J Embryol Exp Morphol. Apr;86:89-108., 1985.

Fambrough DM, Engel AG, Rosenberry TL. *Acetylcholinesterase of human erythrocytes and neuromuscular junctions: homologies revealed by monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A. Feb;79(4):1078-82., 1982.

Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. *Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells*. Bone.;12(4):283-6., 1991.

Farjanel J, Schürmann G, Bruckner P. *Contacts with fibrils containing collagen I, but not collagens II, IX, and XI, can destabilize the cartilage phenotype of chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage.;9 Suppl A:S55-63., 2001.

Fedde KN, Blair L, Silverstein J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, Waymire K, Narisawa S, Millán JL, MacGregor GR, Whyte MP. *Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia*. J Bone Miner Res. Dec;14(12):2015-26., 1999.

Felder CE, Harel M, Silman I, Sussman JL. *Structure of a complex of the potent and specific inhibitor BW284C51 with Torpedo californica acetylcholinesterase*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. Oct;58(Pt 10 Pt 2):1765-71. Epub 2002 Sep 28., 2002.

Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, Helms JA. *Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair*. Ann N Y Acad Sci. Oct 23;857:33-42., 1998.

---

---

Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. *Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation.* Endocrinology. Dec;141(12):4728-35., 2000.

Ferrara. *Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis.* Recent Prog Horm Res.;55:15-35; discussion 35-6., 2000.

Forsgren S, Alfredson H, Bjur D, Rantapää-Dahlqvist S, Norrgård O, Dalén T, Danielson P. *Novel information on the non-neuronal cholinergic system in orthopedics provides new possible treatment strategies for inflammatory and degenerative diseases.* Orthop Rev (Pavia). Jun 30;1(1):e11., 2009.

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al. *Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene.* Nature. Dec 8;372(6506):525-30., 1994.

Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedingner M, Malaval L, Rousset B, Samarut J. *The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production.* EMBO J. Jul 16;16(14):4412-20., 1997.

Francis-West PH, Tatla T, Brickell PM. *Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes Bmp-4 and Bmp-2 in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia.* Dev Dyn. Oct;201(2):168-78., 1994.

Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, Ogita K, Komori T. *Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling.* J Cell Biol. Jul 5;166(1):85-95. Epub 2004 Jun 28., 2004.

Galotto M, Campanile G, Robino G, Cancedda FD, Bianco P, Cancedda R. *Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo.* J Bone Miner Res. Aug;9(8):1239-49., 1994.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. *Bone sialoprotein.* Crit Rev Oral Biol Med.;10(1):79-98., 1999.

Genever PG, Birch MA, Brown E, Skerry TM. *Osteoblast-derived acetylcholinesterase: a novel mediator of cell-matrix interactions in bone?* Bone. Apr;24(4):297-303., 1999.

Gerber HP, Ferrara N. *Angiogenesis and bone growth.* Trends Cardiovasc Med. Jul;10(5):223-8., 2000.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.* Nat Med. Jun;5(6):623-8., 1999.

Gerstenfeld LC, Shapiro FD. *Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development.* J Cell Biochem. Jul;62(1):1-9., 1996.

Gibson GJ, Schor SL, Grant ME. *Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: synthesis of a low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels.* J Cell Biol. Jun;93(3):767-74., 1982.

Gofflot F, Hars C, Illien F, Chevy F, Wolf C, Picard JJ, Roux C. *Molecular mechanisms underlying limb anomalies associated with cholesterol deficiency during gestation: implications of Hedgehog signaling.* Hum Mol Genet. May 15;12(10):1187-98., 2003.

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. *The control of chondrogenesis.* J Cell Biochem. Jan 1;97(1):33-44., 2006.

---

---

Greenfield. *Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease.* Neurochem Int. May-Jun;28(5-6):485-90, 1996.

Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Reynolds PR, Rosier RN, O'Keefe RJ. *BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation.* J Bone Miner Res. Apr;14(4):475-82., 1999.

Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. *BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog.* J Orthop Res. Jan;19(1):18-25., 2001.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. *Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology.* Eur J Biochem. Sep;264(3):672-86., 1999.

Gu Q, Zhu HM, Zhang XJ. *Apoptosis of rat osteoblasts in process of calcification in vitro.* Acta Pharmacol Sin. Sep;23(9):808-12., 2002.

Gullahorn L, Lippiello L, Karpman R. *Smoking and osteoarthritis: differential effect of nicotine on human chondrocyte glycosaminoglycan and collagen synthesis.* Osteoarthritis Cartilage. Oct;13(10):942-3., 2005.

Habuchi H, Conrad HE, Glaser JH. *Coordinate regulation of collagen and alkaline phosphatase levels in chick embryo chondrocytes.* J Biol Chem. Oct 25;260(24):13029-34., 1985.

Hall BK, Miyake T. *All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development.* Bioessays. Feb;22(2):138-47., 2000.

Hall BK, Miyake T. *Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited.* Int J Dev Biol. Dec;39(6):881-93., 1995 .

Hall BK, Miyake T. *The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis.* Anat Embryol (Berl). Jul;186(2):107-24., 1992.

Hamburger V, Hamilton HL. *A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951.* Dev Dyn. Dec;195(4):231-72., 1992.

Hatori M, Klatte KJ, Teixeira CC, Shapiro IM. *End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes.* J Bone Miner Res. Dec;10(12):1960-8., 1995.

Hauschka PV, Wians FH Jr. *Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone.* Anat Rec. Jun;224(2):180-8., 1989.

Hirsch MS, Lunsford LE, Trinkaus-Randall V, Svoboda KK. *Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated.* Dev Dyn. Nov;210(3):249-63., 1997.

Horton. *In vitro chondrogenesis in human chondrodysplasias.* Am J Med Genet. Jan 15;45(2):179-82., 1993.

Hsu HH, Morris DC, Davis L, Moylan P, Anderson CH. *In vitro Ca deposition by rat matrix vesicles: is the membrane association of alkaline phosphatase essential for matrix vesicle-mediated calcium deposition?* Int J Biochem. Dec;25(12):1737-42., 1993.

Hynes. *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.* Cell. Sep 20;110(6):673-87., 2002.

Hynes. *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.* Cell. Apr 3;69(1):11-25., 1992.

Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. *Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice.* Dev Dyn. Apr;214(4):279-90., 1999.

---

- 
- Inkson CA, Brabbs AC, Grewal TS, Skerry TM, Genever PG. *Characterization of acetylcholinesterase expression and secretion during osteoblast differentiation*. Bone. Oct;35(4):819-27., 2004.
- Iwamoto M, Kitagaki J, Tamamura Y, Gentili C, Koyama E, Enomoto H, Komori T, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M. *Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)*. Osteoarthritis Cartilage. Jan;11(1):6-15., 2003.
- Jiang H, Zhang XJ. *Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme*. FEBS J. 275(4):612-7. Epub 2008 Jan 17., 2008.
- Jin QH, He HY, Shi YF, Lu H, Zhang XJ. *Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells*. Acta Pharmacol Sin. Aug;25(8):1013-21, 2004.
- Johnson G, Moore SW. *Human acetylcholinesterase binds to mouse laminin-1 and human collagen IV by an electrostatic mechanism at the peripheral anionic site*. Neurosci Lett. Jan 30;337(1):37-40., 2003.
- Johnson G, Moore SW. *Identification of a structural site on acetylcholinesterase that promotes neurite outgrowth and binds laminin-1 and collagen IV*. Biochem Biophys Res Commun. Jun 25;319(2):448-55., 2004.
- Johnson G, Moore SW. *The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design*. Curr Pharm Des.;12(2):217-25., 2006.
- Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" method for cholinesterases. J Histochem Cytochem. Mar;12:219-21., 1964.
- Karsenty G, Wagner EF. *Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development*. Dev Cell. Apr;2(4):389-406., 2002.
- Karsenty. *Transcriptional control of skeletogenesis*. Annu Rev Genomics Hum Genet.;9:183-96., 2008.
- Karsenty. *Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development*. Front Biosci. Aug 1;3:d834-7., 1998.
- Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, Umezawa A. *Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. PLoS One.;3(12):e3945., 2008.
- Kelley RO, Fallon JF. *Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud*. J Embryol Exp Morphol. Aug;46:99-110., 1978 .
- Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. *Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1*. Mech Dev. Feb;80(2):159-70., 1999.
- Kim KS, Yoon ST, Park JS, Li J, Park MS, Hutton WC. *Inhibition of proteoglycan and type II collagen synthesis of disc nucleus cells by nicotine*. J Neurosurg. Oct;99(3 Suppl):291-7., 2003.
- Kirsch. *Determinants of pathological mineralization*. Curr Opin Rheumatol. Mar;18(2):174-80., 2006.
- Kirsch T, Nah HD, Demuth DR, Harrison G, Golub EE, Adams SL, Pacifici M. *Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization*. Biochemistry. Mar 18;36(11):3359-67., 1997.
- Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. *Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes*. J Cell Biol. Jun 2;137(5):1149-60., 1997.
- Knothe Tate ML, Falls TD, McBride SH, Atit R, Knothe UR. *Mechanical modulation of osteochondroprogenitor cell fate*. Int J Biochem Cell Biol.;40(12):2720-38. Epub 2008 May 24., 2008.
-

---

Knudson CB, Toole BP. *Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm*. Dev Biol. Dec;112(2):308-18., 1985.

Knudson CB, Toole BP. *Hyaluronate-cell interactions during differentiation of chick embryo limb mesoderm*. Dev Biol. Nov;124(1):82-90., 1987.

Kobayashi T, Soegiarto DW, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. *Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP*. J Clin Invest. Jul;115(7):1734-42. Epub 2005 Jun 9., 2005.

Komori. *Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors*. J Cell Biochem. Jun 1;95(3):445-53., 2005.

Komori. *Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development*. J Cell Biochem.;87(1):1-8., 2002.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell. May 30;89(5):755-64., 1997.

Kornak U, Mundlos S. *Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach*. Am J Hum Genet. Sep;73(3):447-74. Epub 2003 Jul 31., 2003.

Kosher RA, Kulyk WM, Gay SW. *Collagen gene expression during limb cartilage differentiation*. J Cell Biol. Apr;102(4):1151-6., 1986.

Kosher RA, Solursh M. *Widespread distribution of type II collagen during embryonic chick development*. Dev Biol. Feb;131(2):558-66., 1989.

Kostenuik PJ, Halloran BP, Morey-Holton ER, Bikle DD. *Skeletal unloading inhibits the in vitro proliferation and differentiation of rat osteoprogenitor cells*. Am J Physiol. Dec;273(6 Pt 1):E1133-9., 1997.

Koyama E, Golden EB, Kirsch T, Adams SL, Chandraratna RA, Michaille JJ, Pacifici M. *Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis*. Dev Biol. Apr 15;208(2):375-91., 1999.

Kronenberg. *Developmental regulation of the growth plate*. Nature. May 15;423(6937):332-6., 2003.

Kulyk WM, Upholt WB, Kosher RA. *Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation*. Development. Jul;106(3):449-55., 1989.

Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Jüppner H, Segre GV, Kronenberg HM. *PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth*. Science. Aug 2;273(5275):663-6., 1996.

Layer PG, Weikert T, Alber R. *Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism*. Cell Tissue Res., 1993 Aug;273(2):219-26.

Leboy P, Grasso-Knight G, D'Angelo M, Volk SW, Lian JV, Drissi H, Stein GS, Adams SL. *Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation*. J Bone Joint Surg Am.;83-A Suppl 1(Pt 1):S15-22., 2001.

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. *SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene*. Mol Cell Biol. Apr;17(4):2336-46., 1997.

Lefebvre V, Smits P. *Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation*. Birth Defects Res C Embryo Today. Sep;75(3):200-12., 2005.

Legay. *Why so many forms of acetylcholinesterase?* Microsc Res Tech. Apr 1;49(1):56-72., 2000.

---



- 
- Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Süring K, Majewski F, Tinschert S, Grzeschik KH, Müller D, Knaus P, Nürnberg P, Mundlos S. *Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2*. Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 14;100(21):12277-82. Epub 2003 Oct 1., 2003.
- Li B, Duysen EG, Saunders TL, Lockridge O. *Production of the butyrylcholinesterase knockout mouse*. J Mol Neurosci.;30(1-2):193-5., 2006.
- Lin CQ, Bissell MJ. *Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix*. FASEB J. Jun;7(9):737-43., 1993.
- Lind GJ, Chew SJ, Marzani D, Wallman J. *Muscarinic acetylcholine receptor antagonists inhibit chick scleral chondrocytes*. Invest Ophthalmol Vis Sci. Nov;39(12):2217-31., 1998.
- Linsenmayer TF, Chen QA, Gibney E, Gordon MK, Marchant JK, Mayne R, Schmid TM. *Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins*. Development. Jan;111(1):191-6., 1991.
- Linsenmayer TF, Trelstad RL, Toole BP, Gross J. *The collagen of osteogenic cartilage in the embryonic chick*. Biochem Biophys Res Commun. Jun 8;52(3):870-6., 1973.
- Liu PS, Chen YY, Feng CK, Lin YH, Yu TC. *Muscarinic acetylcholine receptors present in human osteoblast and bone tissue*. Eur J Pharmacol. Jan 10;650(1):34-40., 2011.
- Loeser. *Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins*. Arthritis Rheum. Aug;36(8):1103-10., 1993.
- Long F, Linsenmayer TF. *Regulation of growth region cartilage proliferation and differentiation by perichondrium*. Development. Mar;125(6):1067-73., 1998.
- Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. *Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation*. Development. Dec;128(24):5099-108., 2001.
- López-Coviella I, Berse B, Thies RS, Blusztajn JK. *Upregulation of acetylcholine synthesis by bone morphogenetic protein 9 in a murine septal cell line*. J Physiol Paris. Jan-Mar;96(1-2):53-9., 2002.
- Loskutova N, Honea RA, Brooks WM, Burns JM. *Reduced limbic and hypothalamic volumes correlate with bone density in early Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis.;20(1):313-22., 2010.
- Loskutova N, Honea RA, Vidoni ED, Brooks WM, Burns JM. *Bone density and brain atrophy in early Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis.;18(4):777-85., 2009.
- Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL. *Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A)*. Development. Aug;109(4):833-44., 1990.
- Mack A, Robitzki A. *The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study*. Prog Neurobiol. Apr;60(6):607-28., 2000.
- Mackie EJ, Murphy LI. *The role of tenascin-C and related glycoproteins in early chondrogenesis*. Microsc Res Tech. Oct 15;43(2):102-10., 1998.
- Majore, Ingrida. *Optimierung der Kultivierung und Monitoring der Proliferation und Differenzierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen*. Doktorarbeit, Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie der TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2005.
- Makihira S, Yan W, Murakami H, Furukawa M, Kawai T, Nikawa H, Yoshida E, Hamada T, Okada Y, Kato Y. *Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage*. Endocrinology. Jun;144(6):2480-8., 2003.
-

---

Mallein-Gerin F, Kosher RA, Upholt WB, Tanzer ML. *Temporal and spatial analysis of cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb development by in situ hybridization*. Dev Biol. Apr;126(2):337-45., 1988.

Masson P, Lockridge O. *Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior*. Arch Biochem Biophys. Feb 15;494(2):107-20. Epub 2009 Dec 11., 2010.

McGee-Russell. *Histochemical methods for calcium*. J Histochem Cytochem. Jan;6(1):22-42., 1958.

Mello MA, Tuan RS. *High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development*. In Vitro Cell Dev Biol Anim. May;35(5):262-9., 1999.

Meshorer E, Soreq H. *Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies*. Trends Neurosci. Apr;29(4):216-24. Epub 2006 Mar 3., 2006.

Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. *Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation*. Dev Cell. Sep;3(3):439-49., 2002.

Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. *BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation*. Development. Nov;128(22):4523-34., 2001.

Misawa M, Doull J, Uyeki EM. *Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. III. Development of cartilage and bone*. J Toxicol Environ Health. Oct-Nov;10(4-5):551-63., 1982.

Montessuit C, Bonjour JP, Caverzasio J. *Expression and regulation of Na-dependent P(i) transport in matrix vesicles produced by osteoblast-like cells*. J Bone Miner Res. Apr;10(4):625-31., 1995.

Montessuit C, Caverzasio J, Bonjour JP. *Characterization of a Pi transport system in cartilage matrix vesicles. Potential role in the calcification process*. J Biol Chem. Sep 25;266(27):17791-7., 1991.

Morcuende JA, Weinstein SL. *Developmental skeletal anomalies*. Birth Defects Res C Embryo Today. May;69(2):197-207., 2003.

Moreland. *Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action*. Arthritis Res Ther.;5(2):54-67. Epub 2003 Jan 14., 2003.

Mundlos S, Zabel B. *Developmental expression of human cartilage matrix protein*. Dev Dyn. Mar;199(3):241-52., 1994.

Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC. *Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins*. J Bone Miner Metab.;26(5):514-9. Epub 2008 Aug 30., 2008.

Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL. *Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia*. Dev Dyn. Mar;208(3):432-46., 1997.

Naski MC, Ornitz DM. *FGF signaling in skeletal development*. Front Biosci. Aug 1;3:d781-94., 1998.

Nelson E, Jodscheit K, Guo Y. *Maternal passive smoking during pregnancy and fetal developmental toxicity. Part 1: gross morphological effects*. Hum Exp Toxicol. Apr;18(4):252-6., 1999.

Nerlich AG, Kirsch T, Wiest I, Betz P, von der Mark K. *Localization of collagen X in human fetal and juvenile articular cartilage and bone*. Histochemistry. Dec;98(5):275-81., 1992.

---

---

Neuhuber. *Autonomes Nervensystem. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*, 16. Auflage. Band 2: Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Rezeptoren, Haut. Urban & Fischer, München Jena, 595-614, 2004.

Newman SA, Bhat R. *Activator-inhibitor dynamics of vertebrate limb pattern formation*. Birth Defects Res C Embryo Today. Dec;81(4):305-19., 2007.

Nieto MA, Patel K, Wilkinson DG. *In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections*. Methods Cell Biol.;51:219-35., 1996.

Oettling G, Schmidt H, Show-Klett A, Drews U. *Expression of the Ca<sup>2+</sup> mobilizing muscarinic system in the chick embryo correlates with morphogenesis*. Cell Differ. Mar;23(1-2):77-86., 1988.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. *Bone development*. Annu Rev Cell Dev Biol.;16:191-220., 2000.

Olszta MJ, Douglas EP, Gower LB. *Scanning electron microscopic analysis of the mineralization of type I collagen via a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process*. Calcif Tissue Int. May;72(5):583-91. Epub 2003 Mar 6., 2003.

Orimo. *The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease*. J Nippon Med Sch. Feb;77(1):4-12., 2010.

Orr-Urtreger A, Göldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, Dani JA, Patrick JW, Beaudet AL. *Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents*. J Neurosci. Dec 1;17(23):9165-71., 1997.

Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. *How proteases regulate bone morphogenesis*. Ann N Y Acad Sci. May;995:109-16., 2003.

Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. *Matrix remodeling during endochondral ossification*. Trends Cell Biol. Feb;14(2):86-93., 2004.

Oshima O, Leboy PS, McDonald SA, Tuan RS, Shapiro IM. *Developmental expression of genes in chick growth cartilage detected by in situ hybridization*. Calcif Tissue Int. Sep;45(3):182-92., 1989.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell. May 30;89(5):765-71., 1997.

Paraoanu LE, Layer PG. *Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation*. FEBS J. Feb;275(4):618-24. Epub 2008 Jan 17., 2008.

Paraoanu LE, Layer PG. *Mouse AChE binds in vivo to domain IV of laminin-1beta*. Chem Biol Interact. Dec 15;157-158:411-3., 2005.

Park SE, Kim ND, Yoo YH. *Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation*. Cancer Res. Apr 15;64(8):2652-5., 2004.

Pateder DB, Ferguson CM, Ionescu AM, Schwarz EM, Rosier RN, Puzas JE, O'Keefe RJ. *PTHrP expression in chick sternal chondrocytes is regulated by TGF-beta through Smad-mediated signaling*. J Cell Physiol. Sep;188(3):343-51., 2001.

Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, Vortkamp A. *Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation*. Dev Biol. May 15;209(2):239-53., 1999.

Pechak DG, Kujawa MJ, Caplan AI. *Morphological and histochemical events during first bone formation in embryonic chick limbs*. Bone.;7(6):441-58., 1986a.

---

---

Pechak DG, Kujawa MJ, Caplan AI. *Morphology of bone development and bone remodeling in embryonic chick limbs*. Bone.;7(6):459-72., 1986b.

Pendás AM, Balbín M, Llano E, Jiménez MG, López-Otín C. *Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13)*. Genomics. Mar 1;40(2):222-33., 1997.

Pizette S, Abate-Shen C, Niswander L. *BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb*. Development. Nov;128(22):4463-74., 2001.

Plate U, Arnold S, Stratmann U, Wiesmann HP, Höhling HJ. *General principle of ordered apatitic crystal formation in enamel and collagen rich hard tissues*. Connect Tissue Res.;38(1-4):149-57; discussion 201-5., 1998.

Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. *Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices*. J Anat. Jan;138 ( Pt 1):113-38., 1984.

Raggatt LJ, Partridge NC. *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling*. J Biol Chem. Aug 13;285(33):25103-8. Epub 2010 May 25., 2010.

Reich A, Drews U. *Choline acetyltransferase in the chick limb bud*. Histochemistry;78(3):383-9., 1983.

Reissmann E, Ernsberger U, Francis-West PH, Rueger D, Brickell PM, Rohrer H. *Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons*. Development. Jul;122(7):2079-88., 1996.

Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA*. Cell. Dec 31;75(7):1401-16., 1993.

Risau. *Mechanisms of angiogenesis*. Nature. Apr 17;386(6626):671-4., 1997.

Roach HI, Erenpreisa J, Aigner T. *Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis*. J Cell Biol. Oct;131(2):483-94., 1995.

Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. *Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation*. Endocrinology. Oct;141(10):3887-97., 2000.

Rojas E, Arispe N, Haigler HT, Burns AL, Pollard HB. *Identification of annexins as calcium channels in biological membranes*. Bone Miner. May;17(2):214-8., 1992.

Romano SJ, Corriveau RA, Schwarz RI, Berg DK. *Expression of the nicotinic receptor alpha 7 gene in tendon and periosteum during early development*. J Neurochem. Feb;68(2):640-8., 1997.

Rosen. *BMP2 signaling in bone development and repair*. Cytokine Growth Factor Rev. Oct-Dec;20(5-6):475-80., 2009.

Rothem DE, Rothem L, Soudry M, Dahan A, Eliakim R. *Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells*. J Bone Miner Metab.;27(5):555-61. Epub 2009 May 13., 2009.

Sandell LJ, Nalin AM, Reife RA. *Alternative splice form of type II procollagen mRNA (IIA) is predominant in skeletal precursors and non-cartilaginous tissues during early mouse development*. Dev Dyn. Feb;199(2):129-40., 1994.

Sato S, Rahemtulla F, Prince CW, Tomana M, Butler WT. *Proteoglycans of adult bovine compact bone*. Connect Tissue Res.;14(1):65-75., 1985.

---

---

Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, Sakata Y, Tomaru Y, Iwata T, Usui M, Aiko K, Yoda T. *Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts*. FEBS Lett. Feb 19;584(4):817-24. Epub 2010 Jan 12., 2010.

Schmidl M, Adam N, Surmann-Schmitt C, Hattori T, Stock M, Dietz U, de Crombrughe B, Pöschl E, von der Mark K. *Twisted gastrulation modulates bone morphogenetic protein-induced collagen II and X expression in chondrocytes in vitro and in vivo*. J Biol Chem. Oct 20;281(42):31790-800., 2006.

Schröder. *Characterization of embryonic cholinesterase in chick limb bud by colorimetry and disk electrophoresis*. Histochemistry;69(3):243-53., 1980.

Seemann P, Schwappacher R, Kjaer KW, Krakow D, Lehmann K, Dawson K, Stricker S, Pohl J, Plöger F, Staub E, Nickel J, Sebald W, Knaus P, Mundlos S. *Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2*. J Clin Invest. Sep;115(9):2373-81., 2005.

SF., Gilbert. *Cell Death and the Formation of Digits and Joints*. Developmental Biology. 6th edition, Sunderland (MA), 2000.

Shakibaei. *Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro*. Exp Cell Res. Apr 10;240(1):95-106., 1998.

Sharma KV, Bigbee JW. *Acetylcholinesterase antibody treatment results in neurite detachment and reduced outgrowth from cultured neurons: further evidence for a cell adhesive role for neuronal acetylcholinesterase*. J Neurosci Res. Aug 15;53(4):454-64., 1998.

Shum L, Nuckolls G. *The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton*. Arthritis Res.;4(2):94-106. Epub 2001 Nov 8., 2002.

Slavkin HC, Croissant R, Bringas P Jr. *Epithelial-mesenchymal interactions during odontogenesis. 3. A simple method for the isolation of matrix vesicles*. J Cell Biol. Jun;53(3):841-9., 1972.

Sternfeld M, Ming G, Song H, Sela K, Timberg R, Poo M, Soreq H. *Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini*. J Neurosci. Feb 15;18(4):1240-9., 1998.

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z. *Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice*. Development. Dec;131(23):5883-95., 2004.

St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. *Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation*. Genes Dev. Aug 15;13(16):2072-86., 1999.

Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S. *Role of Runx genes in chondrocyte differentiation*. Dev Biol. May 1;245(1):95-108., 2002.

Suda. *Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a regulating factor of endochondral bone formation*. Oral Dis. Dec;3(4):229-31., 1997.

Syversen U, Nordsletten L, Falch JA, Madsen JE, Nilsen OG, Waldum HL. *Effect of lifelong nicotine inhalation on bone mass and mechanical properties in female rat femurs*. Calcif Tissue Int. Sep;65(3):246-9., 1999.

Szegletes T, Mallender WD, Rosenberry TL. *Nonequilibrium analysis alters the mechanistic interpretation of inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands*. Biochemistry. Mar 24;37(12):4206-16., 1998.

Taylor P, Radić Z. *The cholinesterases: from genes to proteins*. Annu Rev Pharmacol Toxicol.;34:281-320. Review., 1994.

---

---

Theiler, Karl. *The House Mouse: Atlas of Mouse Development*. Springer-Verlag GmbH; Auflage: 2nd printing, New York, 1989.

Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, Jowett A. *Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development*. Anat Rec. Jun;245(2):151-61., 1996 .

Thorogood PV, Hinchliffe JR. *An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb*. J Embryol Exp Morphol. Jun;33(3):581-606., 1975 .

Tickle C, Münsterberg A. *Vertebrate limb development--the early stages in chick and mouse*. Curr Opin Genet Dev. Aug;11(4):476-81., 2001.

Toole BP, Jackson G, Gross J. *Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun;69(6):1384-6., 1972.

Tsonis PA, Walker E. *Cell populations synthesizing cartilage proteoglycan core protein in the early chick limb bud*. Biochem Biophys Res Commun. Jan 31;174(2):688-95., 1991.

Tuan. *Biology of developmental and regenerative skeletogenesis*. Clin Orthop Relat Res. Oct;(427 Suppl):S105-17., 2004.

Ulici V, Hoenselaar KD, Gillespie JR, Beier F. *The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation*. BMC Dev Biol. Apr 11;8:40., 2008.

Umezū Y, Nagata N, Doi Y, Furukawa H, Sagara T, Hayashida T, Ogata H, Fujimoto S. *Cytochemical and immunocytochemical demonstration of acetylcholinesterase of the prenatal rat lower limb*. Arch Histol Cytol. Jun;56(2):217-24., 1993 .

van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. *Systemic and local regulation of the growth plate*. Endocr Rev. Dec;24(6):782-801., 2003.

Vanittanakom P, Drews U. *Ultrastructural localization of cholinesterase during chondrogenesis and myogenesis in the chick limb bud*. Anat Embryol (Berl.);172(2):183-94., 1985.

Vogel-Höpker, Laura E. Sperling and Paul G. Layer. *Co-opting functions of cholinesterases in neural, limb and stem cell development*. 2010.

von der Mark K, Conrad G. *Cartilage cell differentiation: review*. Clin Orthop Relat Res. Mar-Apr;(139):185-205., 1979.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. *Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein*. Science. Aug 2;273(5275):613-22., 1996.

Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ. *Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair*. Mech Dev. Feb;71(1-2):65-76., 1998.

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. *MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes*. Cell. May 1;93(3):411-22., 1998.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantés J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. *Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9*. Cell. Dec 16;79(6):1111-20., 1994.

Walker LM, Preston MR, Magnay JL, Thomas PB, El Haj AJ. *Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture*. Bone. Jun;28(6):603-8., 2001.

---

- 
- Wang W, Xu J, Kirsch T. *Annexin-mediated Ca<sup>2+</sup> influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis*. J Biol Chem. Feb 7;278(6):3762-9. Epub 2002 Nov 22., 2003.
- Weiner S, Traub W. *Bone structure: from angstroms to microns*. FASEB J. Feb 1;6(3):879-85., 1992.
- Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. *Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation*. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 17;93(19):10240-5., 1996.
- Weisser J, Riemer S, Schmidl M, Suva LJ, Pöschl E, Bräuer R, von der Mark K. *Four distinct chondrocyte populations in the fetal bovine growth plate: highest expression levels of PTH/PTHrP receptor, Indian hedgehog, and MMP-13 in hypertrophic chondrocytes and their suppression by PTH (1-34) and PTHrP (1-40)*. Exp Cell Res. Sep 10;279(1):1-13., 2002.
- Wenzel, Hans Markus. *Identifizierung neuer Zielgene im Indian-Hedgehog Signalweg*. Inaugural-Dissertation, Otto-Warburg-Laboratorium am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Arbeitsgruppe Dr. A. Vortkamp, Freien Universität Berlin, 2003.
- Werb. *ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology*. Cell. Nov 14;91(4):439-42., 1997.
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. *The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans*. Jpn J Pharmacol. Jan;85(1):2-10. Review., 2001.
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ. *The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology*. Life Sci. Mar 28;72(18-19):2055-61. Review., 2003.
- Whyte. *Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia*. Ann N Y Acad Sci. Mar;1192:190-200., 2010.
- Wozney. *The bone morphogenetic protein family and osteogenesis*. Mol Reprod Dev. Jun;32(2):160-7., 1992.
- Wu CW, Tchetina EV, Mwale F, Hasty K, Pidoux I, Reiner A, Chen J, Van Wart HE, Poole AR. *Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization*. J Bone Miner Res. Apr;17(4):639-51., 2002.
- Wuelling M, Vortkamp A. *Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification*. Pediatr Nephrol. Apr;25(4):625-31. Epub 2009 Dec 1., 2010.
- Xiao ZS, Hjelmeland AB, Quarles LD. *Selective deficiency of the "bone-related" Runx2-II unexpectedly preserves osteoblast-mediated skeletogenesis*. J Biol Chem. May 7;279(19):20307-13. Epub 2004 Mar 7., 2004.
- Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O. *Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase*. J Pharmacol Exp Ther. Jun;293(3):896-902., 2000.
- Xie W, Wilder PJ, Stribley J, Chatonnet A, Rizzino A, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O. *Knockout of one acetylcholinesterase allele in the mouse*. Chem Biol Interact. May 14;119-120:289-99., 1999.
- Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC, Firestein GS. *Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta*. J Immunol. Feb 1;168(3):1405-12., 2002.
- Ye W, Gong X, Xie J, Wu J, Zhang X, Ouyang Q, Zhao X, Shi Y, Zhang X. *AChE deficiency or inhibition decreases apoptosis and p53 expression and protects renal function after ischemia/reperfusion*. Apoptosis. Apr;15(4):474-87., 2010.
- Yokouchi Y, Sakiyama J, Kameda T, Iba H, Suzuki A, Ueno N, Kuroiwa A. *BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds*. Development. Dec;122(12):3725-34., 1996.
-

---

Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T. *Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog*. Genes Dev. Apr 15;18(8):952-63., 2004.

Young. *Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis*. Osteoporos Int.;14 Suppl 3:S35-42. Epub 2003 Mar 12., 2003.

Zenker W, Drenkhahn D. *Feinstruktur des Nervengewebes. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. 15. Auflage. Band 2: Niere, Reproduktionsorgane, endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. Urban & München Wien Baltimore, 220-266., 1994.

Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, Guo LH, Alemany M, Zhang LY, Shi YF. *Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types*. Cell Death Differ. Aug;9(8):790-800., 2002.

Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B. *Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis*. Dev Dyn. Aug;209(4):377-86., 1997.

Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B. *Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo*. J Cell Biol. Sep 1;162(5):833-42., 2003.

Zimmerman G, Soreq H. *Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission*. Cell Tissue Res. Nov;326(2):655-69., 2006.

Zimmermann B, Lange K, Mertens P, Bernimoulin JP. *Inhibition of chondrogenesis and endochondral mineralization in vitro by different calcium channel blockers*. Eur J Cell Biol. Feb;63(1):114-21., 1994.

Zou H, Wieser R, Massagué J, Niswander L. *Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage*. Genes Dev. Sep 1;11(17):2191-203., 1997.

---



---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

---

Hiermit erkläre ich, Janine Klaczinski, ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 27. Februar 2013

---